

COMPUESTO QUE SE DIRIGE A IL-23A Y AL FACTOR DE ACTIVACIÓN DE
LINFOCITOS B (BAFF) Y USOS DE ESTOS

SOLICITUD RELACIONADA

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de
presentación según el párrafo 119 del título 35 del USC de las
solicitudes provisionales estadounidenses número de serie
62/196,170, presentada el 23 de julio de 2015; n° de serie
10 62/201,067, presentada el 4 de agosto de 2015; y el n° de serie
62/355,302, presentada el 27 de junio, 2016, todas tituladas
COMPOUND TARGETING IL-23A AND B-CELL ACTIVATING FACTOR (BAFF)
AND USES THEREOF, contenidos de las cuales se incorporan
mediante referencia a la presente en su totalidad.

15

ANTECEDENTES

La inflamación implica una respuesta inmunitaria innata y
adaptable que es necesaria para combatir la infección. Sin
20 embargo, cuando la inflamación se vuelve una enfermedad
autoinflamatoria o autoinmunitaria desenfrenada, puede
desarrollarse una enfermedad neurodegenerativa e incluso
cáncer. Se conoce que las citosinas proinflamatorias tales como
IL1, BAFF, TNF-alfa, IL6, IL12, IL17, IL18 e IL23 se ven

implicadas en la inflamación y las vías específicas que activan células inmunitarias. Sin embargo, no está claro si o cómo la inhibición de una o más de estas citosinas podría tener como resultado el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o autoinflamatorias.

La interleucina 23 (IL23) es una citosina heterodimérica que consiste en dos subunidades, p40 y p19. También se hace referencia a la subunidad p19 como IL-23A. Mientras que la subunidad p19 es única de IL23, la subunidad p40 se comparte con la citosina IL12. IL23 surge actualmente como un regulador clave de las células linfoides innatas (ILC, por sus siglas en inglés), Th17, $\gamma\delta$ T patogénicas que provocan la producción de IL17, IL22 y otras citosinas que provocan daño e inflamación del tejido local. IL23 promueve la regulación por aumento de la metaloproteinasa de la matriz MMP9, aumenta la angiogénesis, reduce la infiltración de linfocitos T CD8+ y ha estado implicada en el desarrollo de tumores cancerosos. Además, junto con IL6 y TGF β 1, IL23 estimula linfocitos T CD4+ sin tratamiento para diferenciarse en linfocitos Th17. A su vez, los linfocitos Th17 producen IL17, una citosina proinflamatoria que potencia el cebado de linfocitos T y estimula la producción de citosinas proinflamatorias tales como IL1, IL6, TNF-alfa, NOS-2, y también inducen la expresión de quimiosinas que

provocan inflamación y la patogénesis de la enfermedad. IL23 ejerce sus efectos mediante un receptor de la superficie celular compuesto de la subunidad IL12 β 1 del receptor de IL12 emparejado con una única subunidad IL23R. La expresión de IL23R se restringe a poblaciones específicas de células inmunitarias y se encuentra principalmente en subconjuntos de linfocitos T (TCR+ $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) y linfocitos NK.

En ratones, la ablación genética del gen IL23p19 provoca la pérdida selectiva de la función de IL23 acompañada por respuestas inmunitarias dependientes de T seriamente comprometidas, que incluyen una producción reducida de inmunoglobulinas específicas del antígeno y respuestas de hipersensibilidad de tipo retardadas disminuidas (Ghilardi N, et ál. (2004) J. Immunol. 172(5): 2827-33). Los ratones inactivados con deficiencia de IL23p40 o IL23p19, o en cualquiera de las subunidades del receptor de IL23 (IL23R e IL12 β 1), desarrollan síntomas menos graves en los modelos animales de esclerosis múltiple, artritis y enfermedad inflamatoria intestinal. Se han obtenido resultados similares mediante el uso de un anticuerpo específico para IL23p19 en EAE y un modelo de colitis mediado por linfocitos T confirma además la función de IL23 en estas configuraciones de enfermedad (Chen Y. et ál. (2006) J. Clin. Invest. 116(5):1317-

26; Elson CO. et ál. (2007) *Gastroenterology* 132(7): 2359-70).
Esto resalta la importancia de IL23 en la inflamación crónica
(Langowski et ál. (2006) *Nature* 442 (7101): 461-5; Kikly K, et
ál. (2006) *Curr. Opin. Immunol.* 18 (6): 670-5). Además, la
5 producción elevada de IL23 ha estado implicada como un factor
principal en la artritis inflamatoria y en las enfermedades
autoinmunitarias inflamatorias (Adamopoulos et ál. (2011) *J.*
Immunol. 187: 593-594; y Langris et ál. (2005) *J. Exp. Med.*
201:233-240). Se ha publicado una conexión entre IL23, su
10 citosina corriente abajo IL22 y la formación ósea en un sistema
de modelos de ratón en el cual se sobreexpresa IL23 (Sherlock
et ál. (2012) *Nat. Med.* 18: 1069-76).

El factor de activación de linfocitos B (BAFF, por sus siglas
15 en inglés) es una citosina que pertenece a la superfamilia del
ligando del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en
inglés) y actúa como el ligando para los receptores BAFF-R
(BR3), TACI (activador transmembrana y modulador de calcio e
interactor del ligando de ciclofilina) y BCMA (antígeno de
20 maduración de linfocitos B). La interacción entre BAFF y sus
receptores activa las señales esenciales para la formación y
mantenimiento de los linfocitos B, que, a su vez, sintetizan
inmunoglobulinas en respuesta a la invasión por parte de la
sustancia foránea. Los niveles adecuados de BAFF en un paciente

ayudan a mantener niveles normales de inmunidad mientras que niveles inadecuados pueden conducir a una inmunodeficiencia y niveles excesivos pueden tener como resultados una producción de anticuerpos anómalamente alta. Cuando un paciente exhibe autoinmunidad, produce anticuerpos contra los tejidos u órganos de su propio cuerpo. Las enfermedades autoinmunitarias, que incluyen lupus eritematoso y artritis reumatoide, tienen como resultado niveles excesivos de BAFF en el cuerpo. Por lo tanto, es importante modular la producción de BAFF con el fin de tratar a los pacientes que tienen estas enfermedades.

El BAFF puede existir en tres formas: unido a la membrana (mbBAFF), BAFF trimérico soluble (sBAFF) y una forma multimérica que consiste en 60 monómeros de BAFF (BAFF 60mer). La importancia relativa de las diversas formas de BAFF en una fisiología normal y de enfermedad no se entiende totalmente. Como se observó, el BAFF se une a tres receptores, BAFFR (BR3), TACI y BCMA. Un ligando de inducción de la proliferación (APRIL), un miembro relacionado de la familia del ligando receptor del TNF, mostró unirse con gran afinidad al TACI y BCMA. En contraste con la interacción APRIL:BCMA de gran afinidad, la interacción BAFF:BCMA tiene baja afinidad (1-2 μ M) y no se cree que juegue un papel importante in vivo (Bossen y Schneider, 2006).

El BAFF soluble se expresa a niveles altos en individuos con lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés) y órganos objetivos inflamados tales como el riñón. El BAFF soluble sirve como un factor crítico para la homeostasis y supervivencia de linfocitos B (Kalled et ál., 2005; Mackay et al., 2003; Smith and Cancro, 2003; Patke et ál., 2004). La formación de anticuerpos por parte de los linfocitos B dependientes de BAFF tiene como resultado los depósitos de IC glomerulares, inicialmente en la membrana basal glomerular (GBM, por sus siglas en inglés), tejido del mesangio e intersticial dentro de las células epiteliales tubulares proximales (PTEC, por sus siglas en inglés) Estos depósitos de IC conducen a una fijación del complemento y activación de neutrófilos que tiene como resultado un daño renal local. Los mediadores inflamatorios (por ejemplo, IL6, IL8, MCP-1) producidos por las células renales dañadas (MC, PTEC, fibroblastos renales, células endoteliales) alimentan un ciclo inflamatorio mediante el aumento en la infiltración de células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, células dendítricas, neutrófilos y macrófagos).

El anticuerpo monoclonal anti-BAFF belimumab (Benlysta®) tiene la capacidad demostrada de disminuir la formación de autoanticuerpos y brinda un beneficio significativo a los

pacientes con lupus eritematoso sistémicos (SLE). Sin embargo, la eficacia de belimumab en pacientes con SLE es moderada como mucho y existe sustancialmente mucho para mejorar (Furie et ál., 2011). Por lo tanto, aún existe una necesidad de nuevas composiciones con una mayor eficacia para tratar y prevenir enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias. Adicionalmente, la identificación de tratamientos más eficaces debería permitir la administración de dosificaciones reducidas, así como costos más bajos asociados al tratamiento.

10

COMPENDIO

En la presente se proporcionan compuestos específicos para BAFF e IL23, composiciones que comprenden dichos compuestos, así como también métodos para utilizarlos y producirlos.

15

Los aspectos de la descripción se refieren a un compuesto que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido donde:

20 (A) dicho primer polipéptido comprende:

(i) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específico para una primera proteína objetivo;

(ii) un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específico para una segunda proteína objetivo; y

5

(iii) una región bisagra, una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3); y

(B) dicho segundo polipéptido comprende:

10

(i) un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2) específico para dicha segunda proteína objetivo;

15 (ii) un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) específico para dicha primera proteína objetivo;

donde:

20

a) dichos VL1 y VH1 se asocian para formar un sitio de unión que se une a dicha primera proteína objetivo;

b) dichos VL2 y VH2 se asocian para formar un sitio de unión

que se une a dicha segunda proteína objetivo;

c) dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición
5 254 y un ácido glutámico en la posición 256, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat; y

d) dicha primera proteína objetivo es BAFF y dicha segunda proteína objetivo es IL-23A o dicha primera proteína objetivo
10 es IL-23A y dicha segunda proteína objetivo BAFF,

y donde:

(i) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:2, dicho VH1 comprende la
15 SEQ ID NO:1, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(ii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:2 y dicho VH2
20 comprende la SEQ ID NO:1; o

(iii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:85, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:84, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:4; o

(iv) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:85 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:84; o

5

(v) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:87, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:86, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

10 (vi) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:87 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:86; o

(vii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:89, dicho VH1 comprende
15 la SEQ ID NO:88, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(viii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:89 y dicho
20 VH2 comprende la SEQ ID NO:88; o

(xi) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:91, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:90, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(x) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:91 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:90.

5

En algunas modalidades, dicho primer polipéptido comprende además un primer enlazador entre dicho VL1 y dicho VH2 y dicho segundo polipéptido comprende además un segundo enlazador entre dicho VL2 y dicho VH1. En algunas modalidades, dicho primer enlazador o dicho segundo enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, dicho primer enlazador y dicho segundo enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, dicho primer polipéptido comprende además un tercer enlazador entre dicho VH2 o dicho VL1 y dicha región bisagra, y dicho segundo polipéptido además comprende un cuarto enlazador luego de dicho VH1 (en su extremo C) o dicho VL2 (en su extremo C). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) y dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En otras modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

10

15

20

aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83) y dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) o la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En otras modalidades, dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) o la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72) o la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71). En algunas modalidades, dicho cuarto enlazador comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71) o la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72) y dicho cuarto enlazador comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71)

En algunas modalidades, dicho primer polipéptido comprende además un dominio de región constante de cadena pesada 1 (CH1)

entre dicho VH2 o dicho VL1 (dependiendo de la configuración) y la región bisagra y dicho segundo polipéptido además comprende un dominio de región constante de cadena ligera (CL) en el extremo C de dicho VH1 o VL2 (dependiendo de la configuración), donde dicho CL y dicho CH1 se asocian mediante un enlace disulfuro para formar un dominio C1. En algunas modalidades, dicho primer enlazador (entre dicho VL1 y dicho VH2) o dicho segundo enlazador (entre dicho VL2 y dicho VH1) comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69).

En algunas modalidades, dicho primer enlazador y dicho segundo enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, dicho primer polipéptido comprende además un tercer enlazador entre dicho VH2 o dicho VL1 (dependiendo de la configuración) y dicho CH1, y dicho segundo polipéptido comprende además un cuarto enlazador entre dicho VH1 o dicho VL2 (dependiendo de la configuración) y dicho CL. En algunas modalidades, dicho tercer enlazador o dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70) En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70) En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto enlazador comprende un residuo de cisteína opcional. En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia

de aminoácidos GGCGGG (SEQ ID NO:135) o LGGCGGGS (SEQ ID NO:136).

En algunas modalidades, dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat para un anticuerpo convencional.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de dicha región bisagra, dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) o dicha región constante de cadena pesada 3 (CH3) se obtiene a partir de IgG1 o de IgG4. En algunas modalidades, dicha región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:76). La región bisagra de la SEQ ID NO:76 se encuentra en, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO:5. En otras modalidades, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:130). La región bisagra de la SEQ ID NO:130 se encuentra en, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO:9. En aun otras modalidades, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:134). La región bisagra de la SEQ ID NO:134 se encuentra en, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO:13.

En algunas modalidades, dicho compuesto comprende dos de dicho primer polipéptido y dos de dicho segundo polipéptido, donde dichos dos del primer polipéptido se asocian entre sí mediante al menos un enlace disulfuro. En algunas modalidades, dicho compuesto comprende dos de dicho primer polipéptido y dos de dicho segundo polipéptido, donde dichos dos del primer polipéptido se asocian entre sí mediante al menos un enlace disulfuro y donde cada uno de dicho primer polipéptido se asocia a uno de dicho segundo polipéptido mediante al menos un enlace disulfuro.

En algunas modalidades,

(i) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; o

(ii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o

(iii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; o

(iv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; o

5

(v) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; o

10 (vi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; o

15 (vii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18; o

(viii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; o

(ix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; o

(x) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; o

5

(xi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26; o

10 (xii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; o

(xiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
15 aminoácidos de SEQ ID NO:29 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30; o

(xiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

(xv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

(xvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36; o

5

(xvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

10 (xviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40; o

(xix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
15 aminoácidos de SEQ ID NO:41 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

(xx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44; o

(xxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

(xxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o

5

(xxiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

10 (xxiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52; o

(xxv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
15 aminoácidos de SEQ ID NO:53 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

(xxvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

(xxvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58; o

(xxviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60; o

5

(xxix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62; o

10 (xxx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64; o

(xxxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
15 aminoácidos de SEQ ID NO:65 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66; o

(xxxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

En algunas modalidades, dicho compuesto comprende dos de dicho primer polipéptido y dos de dicho segundo polipéptido, donde dichos dos del primer polipéptido se asocian entre sí mediante

al menos un enlace disulfuro.

En algunas modalidades, dicho compuesto comprende dos de dicho primer polipéptido y dos de dicho segundo polipéptido, y donde

5 la bisagra, la CH2 y CH3, de uno de los primeros polipéptidos se asocia con la bisagra, CH2 y CH3, del otro de los primeros polipéptidos para formar una molécula tetravalente. En algunas modalidades, dicho compuesto comprende dos de dicho primer polipéptido y dos de dicho segundo polipéptido, donde cada uno

10 de dicho primer polipéptido comprende una CH1, una bisagra, una CH2 y una CH3 y cada uno de dicho segundo polipéptido comprende una CL y donde la bisagra, la CH2 y la CH3 de uno del primer polipéptido se asocia a la bisagra, la CH2 y la CH3 del otro del primer polipéptido y la CH1 de cada primer

15 polipéptido se asocia a la CL de dicho segundo polipéptido para formar una molécula tetravalente (por ejemplo, un monómero, un anticuerpo monomérico como se describe en la sección de Ejemplos) (por ejemplo, compuestos E y V). En algunas modalidades, dicho compuesto comprende dos de dicho primer

20 polipéptido y dos de dicho segundo polipéptido, donde cada uno de dicho primer polipéptido comprende un tercer enlazador, una bisagra, una CH2 y una CH3 y cada uno de dicho segundo polipéptido comprende un cuarto enlazador y donde la bisagra, la CH2 y la CH3 de uno del primer polipéptido se asocia a la

bisagra, la CH2 y la CH3 del otro del primer polipéptido y el tercer enlazador de cada primer polipéptido se asocia al cuarto enlazador de uno de dicho segundo polipéptido para formar una molécula tetravalente (por ejemplo, un monómero, un anticuerpo monomérico como se describe en la sección de Ejemplos) (por ejemplo, compuestos U y T).

Otros aspectos de la descripción se refieren a un primer compuesto que compite con un segundo compuesto para unirse a IL-23A y a BAFF, donde dicho primer compuesto comprende un tercer polipéptido y un cuarto polipéptido, donde:

(A) dicho tercer polipéptido comprende:

(i) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específico para una primera proteína objetivo;

(ii) un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específico para una segunda proteína objetivo; y

(iii) una región bisagra, una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3); y

(B) dicho cuarto polipéptido comprende:

(i) un dominio variable de cadena ligera de la segunda
5 inmunoglobulina (VL2) específico para dicha segunda proteína
objetivo;

(ii) un dominio variable de cadena pesada de la primera
inmunoglobulina (VH1) específico para dicha primera proteína
10 objetivo;

y donde

(i) dichos VL1 y VH1 se asocian para formar un sitio de unión
15 que se une a dicha primera proteína objetivo;

(ii) dichos VL2 y VH2 se asocian para formar un sitio de unión
que se une a dicha segunda proteína objetivo; y

20 (iii) dicha primera proteína objetivo es BAFF y dicha segunda
proteína objetivo es IL-23A o dicha primera proteína objetivo
es IL-23A y dicha segunda proteína objetivo BAFF,

y donde dicho segundo compuesto comprende un primer polipéptido

y un segundo polipéptido, donde:

(i) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y dicho segundo polipéptido
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; o

(ii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o
10

(iii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; o

15 (iv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; o

(v) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; o

(vi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; o

(vii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18; o

(viii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; o

10

(ix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; o

15 (x) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; o

(xi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26; o

(xii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; o

(xiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30; o

(xiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

10

(xv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

15 (xvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36; o

(xvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

(xviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40; o

(xix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

(xx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44; o

10

(xxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

15 (xxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o

(xxiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

(xxiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52; o

(xxv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

(xxvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

10

(xxvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58; o

15 (xxviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60; o

(xxix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62; o

(xxx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64; o

(xxxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66; o

(xxxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

10

Otros aspectos de la descripción se relacionan con un compuesto que comprende dos del primer polipéptido y dos del segundo polipéptido;

15 donde dichos dos del primer polipéptido se asocian entre sí mediante al menos un enlace disulfuro y donde cada uno de dicho primer polipéptido se asocia a uno de dicho segundo polipéptido mediante al menos un enlace disulfuro;

20 donde cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende:

(i) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específico para una primera proteína objetivo;

(ii) un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específico para una segunda proteína objetivo;

5

(iii) una región constante de cadena pesada 1 (CH1), una región bisagra, una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3); y

10 donde cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende:

(i) un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2) específico para dicha segunda proteína objetivo;

15

(ii) un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) específico para dicha primera proteína objetivo;

20 (iii) un dominio de región constante de cadena ligera (CL);

donde la bisagra, la CH2 y la CH3 de uno de los primeros polipéptidos se asocia con la bisagra, CH2 y CH3 del otro de los primeros polipéptidos y la CH1 de cada uno de dichos

primeros polipéptidos se asocia con el CL de dichos segundos polipéptidos para formar una molécula tetravalente;

donde

5

a) dichos VL1 y VH1 se asocian para formar un sitio de unión que se une a dicha primera proteína objetivo;

b) dichos VL2 y VH2 se asocian para formar un sitio de unión
10 que se une a dicha segunda proteína objetivo;

c) dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y ácido glutámico en la posición 256, numeradas de acuerdo
15 con el índice EU de Kabat; y

d) dicha primera proteína objetivo es BAFF y dicha segunda proteína objetivo es IL-23A o dicha primera proteína objetivo es IL-23A y dicha segunda proteína objetivo BAFF,

20

y donde:

(i) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:2, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:1, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2

comprende la SEQ ID NO:3; o

(ii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:2 y dicho VH2
5 comprende la SEQ ID NO:1; o

(iii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:85, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:84, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:4; o

10

(iv) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:85 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:84; o

15 (v) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:87, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:86, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(vi) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende
20 la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:87 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:86; o

(vii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:89, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:88, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho

VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(viii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:89 y dicho

5 VH2 comprende la SEQ ID NO:88; o

(ix) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:91, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:90, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

10

(x) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:91 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:90.

15 En algunas modalidades que se relacionan con el aspecto anterior, cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende además un primer enlazador entre dicho VL1 y dicho VH2 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende además un segundo enlazador entre dicho VL2 y dicho VH1. En algunas modalidades,

20 dicho primer enlazador o dicho segundo enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, dicho primer enlazador y dicho segundo enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, cada uno de dichos primeros

polipéptidos comprende además un tercer enlazador entre dicho VH2 (o dicho VL1) y dicha CH1, y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende además un cuarto enlazador entre dicho VH1 (o dicho VL2) y dicha CL. En algunas modalidades, dicho

5 tercer enlazador o dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70) En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70) En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto

10 enlazador comprende un residuo de cisteína opcional. En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGCGGG (SEQ ID NO:135) o LGGCGGGS (SEQ ID NO:136). En algunas modalidades, dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una alanina

15 en la posición 234 y una alanina en la posición 235, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de dicha región bisagra, dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) o dicha región constante de cadena pesada 3 (CH3) se obtiene a partir de IgG1

20 o de IgG4. En algunas modalidades, dicha región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:76), la secuencia de aminoácidos LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:130) o la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:134).

En algunas modalidades,

(i) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:6; o

(ii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:8; o

(iii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:14; o

(iv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:16; o

(v) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; o

5 (vi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26; o

10 (vii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30; o

15 (viii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

20 (ix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

(x) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

5

(xi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

10

(xii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

15

(xiii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

20

(xiv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

(xv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
5 SEQ ID NO:58; o

(xvi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
10 SEQ ID NO:60; o

(xvii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
15 SEQ ID NO:62; o

(xviii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
20 SEQ ID NO:64; o

(xix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:66; o

(xx) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y cada uno de dichos
5 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:68.

Otros aspectos de la descripción se relacionan con un compuesto
que comprende dos del primer polipéptido y dos del segundo
10 polipéptido; donde dichos dos del primer polipéptido se asocian
entre sí mediante al menos un enlace disulfuro y donde cada
uno de dichos primeros polipéptidos se asocia a uno de dichos
segundos polipéptidos mediante al menos un enlace de disulfuro;
y donde (i) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende
15 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:6; o

(ii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:8; o

(iii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; o

5 (iv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; o

10 (v) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; o

15 (vi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26; o

20 (vii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30; o

(viii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

5

(ix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

10

(x) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

15

(xi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

20

(xii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

(xiii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
5 SEQ ID NO:54; o

(xiv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
10 SEQ ID NO:56; o

(xv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
15 SEQ ID NO:58; o

(xvi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
20 SEQ ID NO:60; o

(xvii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:62; o

(xviii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y cada uno de dichos
5 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:64; o

(xix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y cada uno de dichos
10 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:66; o

(xx) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y cada uno de dichos
15 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:68.

Otros aspectos de la descripción se relacionan con un compuesto
que comprende dos del primer polipéptido y dos del segundo
20 polipéptido;

donde dichos dos del primer polipéptido se asocian entre sí
mediante al menos un enlace disulfuro y donde cada uno de dicho
primer polipéptido se asocia a uno de dicho segundo polipéptido

mediante al menos un enlace disulfuro;

donde cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende:

5 (iv) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específico para una primera proteína objetivo;

(v) un dominio variable de cadena pesada de una segunda
10 inmunoglobulina (VH2) específico para una segunda proteína objetivo;

(vi) una región bisagra, una región constante de cadena pesada
2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3); y
15

donde cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende:

(i) un dominio variable de cadena ligera de la segunda
inmunoglobulina (VL2) específico para dicha segunda proteína
20 objetivo; y

(ii) un dominio variable de cadena pesada de la primera
inmunoglobulina (VH1) específico para dicha primera proteína
objetivo;

donde la bisagra, la CH2 y CH3 de uno del primer polipéptido se asocia con la bisagra, la CH2 y la CH3 del otro del primer polipéptido y;

5

donde

e) dichos VL1 y VH1 se asocian para formar un sitio de unión que se une a dicha primera proteína objetivo;

10

f) dichos VL2 y VH2 se asocian para formar un sitio de unión que se une a dicha segunda proteína objetivo;

g) dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y ácido glutámico en la posición 256, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat; y

h) dicha primera proteína objetivo es BAFF y dicha segunda proteína objetivo es IL-23A o dicha primera proteína objetivo es IL-23A y dicha segunda proteína objetivo BAFF,

20 y donde:

(i) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:2, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:1, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

5 (ii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:2 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:1; o

(iii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:85, dicho VH1 comprende
10 la SEQ ID NO:84, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:4; o

(iv) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:85 y dicho
15 VH2 comprende la SEQ ID NO:84; o

(v) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:87, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:86, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

20

(vi) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:87 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:86; o

(vii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:89, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:88, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

5 (viii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:89 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:88; o

(ix) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:91, dicho VH1 comprende
10 la SEQ ID NO:90, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(x) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:91 y dicho VH2
15 comprende la SEQ ID NO:90.

En algunas modalidades que se relacionan con el aspecto anterior, cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende además un primer enlazador entre dicho VL1 y dicho VH2 y cada
20 uno de dichos segundos polipéptidos comprende además un segundo enlazador entre dicho VL2 y dicho VH1. En algunas modalidades, dicho primer enlazador o dicho segundo enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, dicho primer enlazador y dicho segundo enlazador

comprenden la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende además un tercer enlazador entre dicho VH2 o dicho VL1 y dicha región bisagra, y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende además un cuarto enlazador en el extremo C de dicho VH1 o dicho VL2. En algunas modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) y dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En otras modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83) y dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) o la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En otras modalidades, dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) o la

secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72) o la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71). En algunas

5 modalidades, dicho cuarto enlazador comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71) o la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72) y dicho cuarto enlazador comprende la secuencia de

10 aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71) En algunas modalidades, dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de dicha región bisagra, dicha

15 región constante de cadena pesada 2 (CH2) o dicha región constante de cadena pesada 3 (CH3) se obtiene a partir de IgG1 o de IgG4. En algunas modalidades, dicha región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:76), la secuencia de aminoácidos LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID

20 NO:130) o la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:134). En algunas modalidades, (i) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; o

(ii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
5 SEQ ID NO:12; o

(iii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
10 SEQ ID NO:18; o

(iv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
15 SEQ ID NO:20; o

(v) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
20 SEQ ID NO:24; o

(vi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:28; o

(vii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y cada uno de dichos
5 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:32; o

(viii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 y cada uno de dichos
10 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:36; o

(ix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y cada uno de dichos
15 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:40; o

(x) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y cada uno de dichos
20 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:44; o

(xi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y cada uno de dichos

segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o

(xii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:52.

Aun otros aspectos de la descripción se refieren a una
10 composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito
en la presente, tal como un compuesto descrito anteriormente.

Otros aspectos de la descripción se refieren a un método para
tratar una enfermedad autoinmuntaria o inflamatoria que
15 comprende administrar un compuesto descrito en la presente,
tal como un compuesto descrito anteriormente, o una composición
farmacéutica que comprende dicho compuesto a un sujeto.

Aun otros aspectos de la descripción se refieren a un compuesto
20 descrito en la presente, tal como un compuesto descrito
anteriormente, para su uso en la medicina. En algunas
modalidades, dicho uso es el tratamiento de una enfermedad
autoinmuntaria o inflamatoria.

Otros aspectos de la descripción se refieren a una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la presente, tal como un compuesto descrito anteriormente, para su uso en la medicina. En algunas modalidades, dicho uso es el
5 tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

Aun otros aspectos de la descripción se refieren a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido descrito en la presente, tal como un
10 polipéptido descrito anteriormente. Otros aspectos de la invención se refieren a un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el vector comprende un promotor enlazado de forma operativa a dicho ácido nucleico. Otros aspectos de la invención se refieren a una célula que
15 comprende dichos ácido nucleico o dicho vector.

Otros aspectos de la descripción se refieren a un método para producir un compuesto o polipéptido tal como se describe en la presente, tal como un polipéptido descrito anteriormente, que
20 comprende obtener una célula descrita en la presente, tal como una célula descrita anteriormente, y expresar un ácido nucleico tal como se describe en la presente en dicha célula. En algunas modalidades, el método comprende además aislar y purificar dicho polipéptido o compuesto.

Los detalles de una o más modalidades de la descripción se establecen en la descripción a continuación. Otras características o ventajas de la presente descripción
5 resultarán evidentes a partir de las siguientes figuras y la descripción detallada de diversas modalidades y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para mostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente descripción, que pueden entenderse mejor mediante la referencia a una o más de estas
15 figuras en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentadas en la presente.

La Figura 1A es un diagrama de un compuesto de ejemplo específico para BAFF e IL23A. La primera cadena de polipéptidos
20 contiene los dominios de CH3, CH2, VH₂ (VH_{II}) y VL₁ (VL_I). La segunda cadena de polipéptidos contiene los dominios de VH₁ (VH_I) y VL₂ (VL_{II}). VL₁ y VH₁ son específicos para una primera proteína objetivo (ya sea BAFF o IL23A) y VL₂ y VH₂ son específicos para una segunda proteína objetivo (ya sea IL23A o

BAFF). El panel superior muestra cada cadena de polipéptidos por separado. El panel inferior muestra un compuesto tetravalente (por ejemplo, monómero, un anticuerpo monomérico como se describe en la sección de Ejemplos) formado a través de la asociación de los dominios de CH2 y CH3 de un primer polipéptido con los dominios CH2 y CH3 de otro primer polipéptido. Los dominios de unión para la primera y la segunda proteína objetivo se forman a través de la asociación de VH₁ y VL₁ y a través de la asociación de VH₂ y VL₂, respectivamente.

10

La Figura 1B es un diagrama de otro compuesto de ejemplo específico para BAFF e IL23A. La primera cadena de polipéptidos contiene los dominios de CH3, CH2, CH1, VH2 (VH_{II}) y VL₁ (VL_I). La segunda cadena de polipéptidos contiene los dominios de CL, VH₁ (VH_I) y VL₂ (VL_{II}). VL₁ y VH₁ son específicos para una primera proteína objetivo (ya sea BAFF o IL23A) y VL₂ y VH₂ son específicos para una segunda proteína objetivo (ya sea IL23A o BAFF). El panel superior muestra cada cadena de polipéptidos por separado. El panel inferior muestra un compuesto tetravalente (por ejemplo, monómero, un anticuerpo monomérico como se describe en la sección de Ejemplos) formado a través de la asociación de los dominios de CH2 y CH3 de un primer polipéptido con los dominios CH2 y CH3 de otro primer polipéptido. Los dominios de unión para la primera y la segunda

20

proteína objetivo se forman a través de la asociación de VH₁ y VL₁ y a través de la asociación de VH₂ y VL₂, respectivamente. El compuesto se asocia a través de las interacciones entre los dominios de CL y CH1.

5 La Figura 2 es una gráfica que muestra las concentraciones en suero (media $\pm$ SD) para el Compuesto A (cuadrados cerrados), el Compuesto B (cuadrados abiertos), el Compuesto C (triángulos cerrados) y el Compuesto D (triángulos abiertos) en monos cynomolgus luego de una dosis intravenosa de 1 mg/kg única,
10 como se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 3 muestra el perfil de concentración-tiempo de suero humano previsto del Compuesto B, luego de una dosis s.c. de 100 mg administrada una vez cada dos semanas, como se describe
15 en el Ejemplo 11. La línea punteada representa el C_{min} objetivo (30 nM).

La Figura 4 muestra el resumen gráfico del porcentaje de monómeros con respecto a la concentración para el Compuesto B,
20 como se describe en el Ejemplo 14.

La Figura 5 muestra que el Compuesto B mantiene potencia funcional con respecto a anti-BAFF in vivo. Los ratones se dosificaron de forma equimolar con ya sea anti-BAFF o el

Compuesto B y se estimuló con minicírculos de BAFF humano para inducir la expansión de linfocitos B. En el día 14 los bazo
se recolectaron y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar linfocitos B B220+ como una medida de bloqueo
5 funcional de BAFF.

La Figura 6 muestra que el Compuesto B mantiene potencia funcional con respecto a anti-IL23 in vivo. Evaluación del Compuesto B en el ensayo de citosina inducida por IL23. Los
10 ratones se dosificaron de forma equimolar con ya sea anti-IL23 o el Compuesto B y se estimularon con IL23 humanos dos veces para inducir la inflamación del oído. Veinticuatro horas después de la inyección final, se recolectaron las orejas y se analizaron para detectar IL17A de ratón e IL22 de ratón como
15 medición del bloqueo funcional de IL23.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describen en la presente compuestos que se unen a BAFF e
20 IL-23A (también designado como IL23p19 o IL23A). En la actualidad, no existen compuestos aprobados que se dirijan a BAFF e IL23A. Existen estudios limitados con neutralización simultánea de dos/más mediadores inflamatorios clave que utilizan un enfoque bioterapéutico y estos estudios no pudieron

mostrar mejoras en los resultados clínicos que se midieron para la artritis reumatoide (RA). Además, dichas combinaciones pueden aumentar los efectos secundarios, tal como el riesgo a una infección (ver, por ejemplo, Genovese, M.C., Cohen, S., Moreland, L., Lium, D., Robbins, S., et ál. (2004). Arth. Rheum. 50, 1412-9; Genovese, M.C., Cohen, S., Moreland, L., Lium, D., Robbins, S., et ál. (2004). Arth. Rheum. 50, 1412-9; and Weinblatt, M., Schiff, M., Goldman, A. Kremer, J., Luggen, M., et ál. (2007) Ann.Rheum.Dis.66, 228-34)). Además, dichos compuestos biespecíficos han sido difíciles de diseñar debido a problemas relacionados con la solubilidad (por ejemplo, agregación) y la estabilidad (por ejemplo, farmacocinética deficiente).

De manera sorprendente, se descubrió que algunos de los compuestos descritos en la presente que se unen a BAFF y a IL-23A tienen propiedades similares o mejoradas en comparación con anticuerpos individuales que se dirigen a IL-23A o BAFF. También se descubrió que algunos compuestos tienen una farmacocinética adecuada y son solubles en intervalos adecuados a los efectos de la dosificación. Además, en algunas modalidades, hay ventajas de la administración única con respecto a la administración de múltiples dosis individuales desde la perspectiva de los efectos secundarios de las terapias

individuales, y de una menor dosificación. Además, en algunas modalidades, las propiedades de CMC de los compuestos demostraron que algunos compuestos tuvieron temperaturas de fusión altas (T_m) y baja agregación. En un aspecto, un compuesto de ejemplo mostró una agregación particularmente baja en concentraciones altas. Se considera que los compuestos descritos en la presente tienen una o más propiedades favorables, por ejemplo, efectos secundarios disminuidos, facilidad y seguridad de administración mejorada, una semivida aumentada, una afinidad de unión aumentada o una actividad inhibidora aumentada, en comparación con moléculas de anticuerpos estándares, por ejemplo, una molécula de IgG o un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, Fab).

Por consiguiente, los aspectos de la descripción se refieren a compuestos específicos para BAFF e IL-23A, así como a métodos para el uso y la producción de dichos compuestos. En un aspecto, la tecnología objeto se relaciona con composiciones con una eficacia mayor para el tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias, tales como lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus eritematoso sistémico con compromiso renal/lupus nefrítico (LN), vasculitis asociada con ANCA (AAV, por sus siglas en inglés), síndrome de Sjogren primario (pSS), enfermedad de injerto contra huésped crónica (cGVHD, por sus

siglas en inglés), esclerosis sistémica (SSc, por sus siglas en inglés), artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés), soriasis (Ps), espondilitis anquilosante (AS, por sus siglas en inglés) y artritis soriática (PA, por sus siglas en inglés).

5 Un antagonista dual de BAFF/IL23A inhibirá el complejo de autoanticuerpos/inmunitario y el daño final a los órganos mediado por el eje de IL23 y puede lograr una inducción superior y mantenimiento de la respuesta clínica que el Estándar de Cuidados actual para el tratamiento de SLE y LN. En comparación
10 con la coadministración de un anticuerpo BAFF y un anticuerpo IL-23 para inhibir ambas vías al mismo tiempo, un antagonista dual de BAFF/IL23A es más conveniente para el paciente que puede conducir a un mejor cumplimiento y a la reducción del dolor. Un antagonista dual de BAFF/IL23A debería permitir la
15 administración de dosificaciones reducidas, así como también costos más bajos asociados al tratamiento. Además, un antagonista de BAFF/IL23A también puede ser beneficioso en el tratamiento de un grupo de enfermedades que implica linfocitos B/autoanticuerpos desregulados y daño al tejido mediado por
20 IL-23 que incluye síndrome primario de Sjogren (pSS), enfermedad de injerto contra huésped (cGVHD), esclerosis sistémica (SSc) y vasculitis asociada con ANCA (AAV).

Es difícil diseñar una molécula terapéutica de direccionamiento

doble que junta dos entidades farmacológicas y mantiene la potencia funcional de cada componente, mientras que tiene, al mismo tiempo, propiedades biofísicas adecuadas para la fabricación a gran escala. El desarrollo de moléculas de direccionamiento doble se ha visto obstaculizado por varios problemas relacionados con la estabilidad in vitro e in vivo, tales como una expresión, agregación insuficientes, vida útil limitada, estabilidad en suero insuficiente y propiedades farmacocinéticas insuficientes in vivo (Demarest SJ, Glaser SM. (2008). Curr Opin Drug Discov Devel. 11, 675-87).

En la presente, se describe un método para crear moléculas de direccionamiento doble que inhiben la función de BAFF y IL23. La moléculas de direccionamiento doble de la tecnología objeto tienen propiedades ventajosas y sorprendentes tales como temperaturas de fusión altas (T_m), agregación baja en concentraciones altas y propiedades PK humanas previstas que permiten una administración s.c. de una vez cada dos semanas o menos frecuente.

20

Compuestos

Los aspectos de la descripción se relacionan con un compuesto específico para BAFF e IL23A. A continuación se muestra una

secuencia de proteínas de ejemplo para BAFF y una secuencia proteica ilustrativa para IL23A.

Factor de activación de linfocitos B >sp|Q9Y275| (BAFF) -

5 TN13B_HUMAN Miembro de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral 13B OS=Homo sapiens GN=TNFSF13B PE=1 SV=1

MDDSTEREQSRLTSCCLKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLALLSCCL
TVVSFYQVAALQGD LASLRAELQGHHA EKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKIFEP PAPGE
10 GNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAALEEKEN
KILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGH LIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNS
CYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL (SEQ ID NO:80)

>NP_057668.1 - IL23A [Homo sapiens]

15 MLGSRAVMLLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGD
EETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLPDSPVG
QLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAVAAARVFAHG
AATLSP (los aminoácidos 1-19 son una secuencia de señal
20 prevista) (SEQ ID NO:81)

En algunas modalidades, el compuesto comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido. En algunas modalidades, el primer polipéptido comprende (i) un dominio variable de

cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específico para una primera proteína objetivo, (ii) un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específico para una segunda proteína objetivo; y (iii) una
5 región bisagra, una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3). En algunas modalidades, el primer polipéptido comprende además una región constante de cadena pesada 1 (CH1). En algunas modalidades, el segundo polipéptido comprende: (i) un dominio variable de
10 cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2) específico para la segunda proteína objetivo; (ii) un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) específico para la primera proteína objetivo. En algunas modalidades, el segundo polipéptido comprende además una región constante de
15 cadena ligera (CL).

Debe entenderse que los dominios variables y los dominios/regiones constantes del primer polipéptido pueden estar en cualquier orden y que los dominios variables y los
20 dominios/regiones constantes (si los hay) del segundo polipéptido pueden estar en cualquier orden. A continuación se muestran múltiples configuraciones de ejemplo para los dominios/regiones en el primer y el segundo polipéptido desde el extremo N al extremo C.

Configuración 1 del primer polipéptido: N-VL1-VH2-bisagra-CH2-CH3-C

5 Configuración 2 del primer polipéptido: N-VH2-VL1-bisagra-CH2-CH3-C

Configuración 3 del primer polipéptido: N-VL1-VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3-C

10

Configuración 4 del primer polipéptido: N-VH2-VL1-CH1-bisagra-CH2-CH3-C

Configuración 1 del segundo polipéptido: N-VL2-VH1-C

15

Configuración 2 del segundo polipéptido: N-VH1-VL2-C

Configuración 3 del segundo polipéptido: N-VL2-VH1-CL-C

20 Configuración 4 del segundo polipéptido: N-VH1-VL2-CL-C

Las configuraciones de ejemplo del compuesto se muestran en las Figuras 1A y 1B.

En algunas modalidades, las regiones variables del primer

polipéptido y el segundo polipéptido se asocian entre sí para formar un sitio de unión para la primera proteína objetivo y un sitio de unión para la segunda proteína objetivo. En algunas modalidades, el VL1 del primer polipéptido y el VH1 del segundo polipéptido se asocian para formar un sitio de unión que se une a la primera proteína objetivo, y el VL2 del segundo polipéptido y el VH2 del primer polipéptido se asocian para formar un sitio de unión que se une a la segunda proteína objetivo. En algunas modalidades, la primera proteína objetivo es BAFF y la segunda proteína objetivo es IL23A. En otras modalidades, la primera proteína objetivo es IL23A y la segunda proteína objetivo es BAFF. Se entenderá que no se pretende que los términos "primera" y "segunda" impliquen un nivel de importancia para cada proteína objetivo.

15

A continuación se proporcionan combinaciones de ejemplo de secuencias para cada VL1, VH1, VL2 y VH2 en la Tabla 1 y también en la Tabla 2 en el Ejemplo 1.

20 Tabla 1. Combinaciones de ejemplo de secuencias para VL1, VH1, VL2 y VH2.

	Número de la combinación	secuencia de VL1	secuencia de VH1	secuencia de VL2	secuencia de VH2
5	1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
	2	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:1
	3	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 3
10	4	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:84
	5	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
	6	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:86
15	7	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
	8	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:88
	9	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
20	10	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:90

En algunas modalidades, el compuesto comprende una secuencia de VL1 que comprende una primera cadena ligera CDR1, CDR2 y

CDR3 y una secuencia de VH1 que comprende una primera cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3, una secuencia de VL2 que comprende una segunda cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 y una secuencia de VH2 que comprende una segunda cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3.

- 5 En algunas modalidades, las CDR son CDR de una o más de las secuencias de VL1, VH1, VL2 y VH2 proporcionadas en la Tabla 1. A continuación se muestran las secuencias de CDR de cadena ligera y cadena pesada de ejemplo para las secuencias de VL1, VH1, VL2 y VH2 proporcionadas en la Tabla 1:

10

SEQ ID NO: 1 CDR: GGTFNNNAIN (SEQ ID NO:92) (CDR1),
GIIPMFGTAKYSQNFQG (SEQ ID NO:93) (CDR2), SRDLLLFPHHALSP (SEQ
ID NO:94) (CDR3)

- 15 SEQ ID NO: 2 CDR: QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO:95) (CDR1), GKNNRPS
(SEQ ID NO:96) (CDR2), SSRDSSGNHWV (SEQ ID NO:97) (CDR3)

- SEQ ID NO: 3 CDR: GYTFTDQTIH (SEQ ID NO:98) (CDR1),
YIYPRDDSPKYNENFKG (SEQ ID NO:99) (CDR2), PDRSGYAWFIY (SEQ ID
20 NO:100) (CDR3)

SEQ ID NO: 4 CDR: KASRDVAIAVA (SEQ ID NO:101) (CDR1), WASTRHT
(SEQ ID NO:102) (CDR2), HQYSSYPFT (SEQ ID NO:103) (CDR3)

SEQ ID NO: 84 CDR: DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO:104) (CDR1),
EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO:105) (CDR2), GAFDY (SEQ ID NO:106)
(CDR3)

5 SEQ ID NO: 85 CDR: RASQDIGNRLS (SEQ ID NO:107) (CDR1 ATSSLDS
(SEQ ID NO:108) (CDR2), LQYASSPFT (SEQ ID NO:109) (CDR3)

SEQ ID NO: 86 CDR: DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO:110) (CDR1),
EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO:111) (CDR2), GAFDY (SEQ ID NO:
10 112) (CDR3)

SEQ ID NO: 87 CDR: RASQDIGNRLN (SEQ ID NO:112) (CDR1 ATSSLDS
(SEQ ID NO:113) (CDR2), LQYASSPFT (SEQ ID NO:114) (CDR3)

15 SEQ ID NO: 88 CDR: GYSFSTFFIH (SEQ ID NO:115) (CDR1),
RIDPNSGATKYNEKFES (SEQ ID NO:116) (CDR2), GEDLLIRTDALDY (SEQ
ID NO:117) (CDR3)

SEQ ID NO: 89 CDR: KASQNAGIDVA (SEQ ID NO:118) (CDR1), SKSNRYT
20 (SEQ ID NO: 119) (CDR2), LQYRSYPRT (SEQ ID NO:120) (CDR3)

SEQ ID NO: 90 CDR: GYSFSTFFIH (SEQ ID NO:121) (CDR1),
GRIDPNSGATKYNEKFES (SEQ ID NO:122) (CDR2), GEDLLIRTDALDY (SEQ
ID NO:123) (CDR3)

SEQ ID NO: 91 CDR: KASQNAGIDVA (SEQ ID NO:124) (CDR1), SKSNRYT
(SEQ ID NO:125) (CDR2), LQYRSYPRT (SEQ ID NO:126) (CDR3)

5 En algunas modalidades, el compuesto comprende un VH1, VL1,
VH2 y/o VL2 que comprende una secuencia que es al menos 80 %
(por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %)
idéntica (residuo por residuo para la longitud total de la
secuencia) a la secuencia descrita en la Tabla 1. El
10 "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se
determina mediante el uso del algoritmo de Karlin y Altschul
Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:2264-68, 1990, modificada tal
como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:5873-
77, 1993. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST
15 y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et ál. J. Mol. Biol.
215:403-10, 1990. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden
realizarse con el programa XBLAST, valor=50, longitud de
palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a
las moléculas de las proteínas de interés. Cuando existen
20 huecos entre dos secuencias, es posible utilizar Gapped BLAST
tal como se describe en Altschul et ál., Nucleic Acids Res.
25(17):3389-3402, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST
y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros
predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo,

XBLAST y BLAST).

En algunas modalidades, el compuesto comprende un VH1, VL1, VH2 y/o VL2 que comprende una secuencia que comprende una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) mutaciones en una secuencia descrita en la Tabla 1. Dichas mutaciones pueden ser sustituciones conservadoras de aminoácidos. Tal como se usa en la presente, una "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera las características de tamaño o carga relativa de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, sustituciones realizadas entre los aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

Las secuencias de aminoácidos de la región bisagra, CH2 y CH3 del compuesto (y opcionalmente de CH1 y CL, si el compuesto contiene dichas regiones) pueden obtenerse a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, una región constante de un anticuerpo tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena pesada y ligera de los anticuerpos se conocen en la técnica, por ejemplo, las que se proporcionan en la base de datos de

IMGT (www.imgt.org) o en www.vbase2.org/vbstat.php., las cuales se incorporan a la presente mediante referencia. Adicionalmente, en algunos sistemas de expresión, el residuo de lisina del extremo C del dominio CH3 puede retirarse de forma postransduccional. Por consiguiente, el residuo de lisina del extremo C del dominio CH3 es un residuo de aminoácidos opcional. Se proporcionan específicamente mediante la presente invención moléculas que no tienen el residuo de lisina de extremo C del dominio CH3. También se encuentran comprendidas específicamente por la presente invención dichas construcciones que comprenden el residuo de lisina de extremo C del dominio CH3. En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de CH2 y CH3 se obtienen a partir de una IgG1 (por ejemplo, SEQ ID NO:75) o IgG4 (por ejemplo, la SEQ ID NO:73).

En algunas modalidades la CL comprende la secuencia de aminoácidos de una CL kappa o CL lambda. En algunas modalidades, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76). La región bisagra de la SEQ ID NO:76 se encuentra en, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO:5. En otras modalidades, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:130). La región bisagra de la SEQ ID NO:130 se encuentra en, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO:9. La región bisagra de la SEQ ID NO:130 también se encuentra en el comienzo

del dominio Fc de la SEQ ID NO:129. En aun otras modalidades, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:134). La región bisagra de la SEQ ID NO:134 se encuentra en, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO:13. La región bisagra de la SEQ ID NO:134 también se encuentra en el comienzo del dominio Fc de la SEQ ID NO:127.

En algunas modalidades, la CH2 y/o la CH3 del compuesto (y opcionalmente de CH1 y CL, si el compuesto contiene dichas regiones) pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos que difieren de una CH2 o CH3 de tipo salvaje, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos en una CH2 o CH3 de IgG1 de tipo salvaje o una o más sustituciones de aminoácidos en una CH2 o CH3 de IgG4 de tipo salvaje (la SEQ ID NO: 39 proporciona una IgG1 de tipo salvaje de ejemplo). Dichas sustituciones son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, US7704497, US7083784, US6821505, US8323962, US6737056 y US7416727).

En algunas modalidades, la CH2 comprende una sustitución de aminoácidos en 234, 235, 252, 254, y/o 256, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat para un anticuerpo convencional (Kabat et ál. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human

Services, 1991, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia). Se entenderá que todas las posiciones de aminoácidos descritas en la presente se refieren a la numeración del índice EU de Kabat para un anticuerpo convencional. En algunas modalidades, la CH2 comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 252, 254 y/o 256. En algunas modalidades, el aminoácido en la posición 252 es tirosina, fenilalanina, serina, triptófano o treonina. En algunas modalidades, el aminoácido en la posición 254 es treonina. En algunas modalidades, el aminoácido en la posición 254 es serina, arginina, glutamina, ácido glutámico o ácido aspártico. En algunas modalidades, la CH2 comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 (al que se hace referencia en la presente como un mutante YTE). En algunas modalidades, la CH2 comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 234 y/o 235. En algunas modalidades, la CH2 comprende una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235, a la que también se hace referencia en la presente como un mutante KO. En algunas modalidades, la CH2 comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254, un ácido glutámico en la posición 256, una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235, al que se hace referencia en la presente como un mutante KO-YTE.

En algunas modalidades, pueden utilizarse uno o más enlazadores para conectar dominios/regiones entre sí en el primer y/o el segundo polipéptido. Por ejemplo, el primer polipéptido puede comprender un enlazador entre el VL1 y VH2. El primer polipéptido comprende adicionalmente un enlazador entre el VL1 o VH2 (dependiendo de la configuración como se describe anteriormente) y el bisagra (por ejemplo, -VL1-enlazador-bisagra o -VH2-enlazador-bisagra). Si el primer polipéptido comprende una CH1, por ejemplo, el primer polipéptido puede comprender un enlazador entre el VL1 o VH2 (dependiendo de la configuración descrita anteriormente) y la CH1 (por ejemplo, VL1-enlazador-CH1 o VH2-enlazador-CH1). En otro ejemplo, el segundo polipéptido puede comprender un enlazador entre el VL2 y VH1. El segundo polipéptido puede comprender además un enlazador luego del VL2 o VH1 (dependiendo de la configuración tratada anteriormente, por ejemplo, -VL2-enlazador o -VH1-enlazador) en el extremo C de la cadena de polipéptidos. Si el segundo polipéptido comprende además una CL, el segundo polipéptido puede comprender además un enlazador entre el VL2 o VH1 (dependiendo de la configuración como se trató anteriormente) y la CL (como en, por ejemplo, VL2-enlazador-CL o VH1-enlazador-CL). Se entenderá que puede utilizarse cualquier cantidad de enlazadores para conectar cualquier

dominio o región a cualquier otro dominio o región en el primer polipéptido y/o que puede utilizarse cualquier cantidad de enlazadores para conectar cualquier dominio o región a cualquier otro dominio o región en el segundo polipéptido.

5

Se contempla cualquier enlazador conocido en la técnica para su uso en la presente. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador peptídico. En algunas modalidades, el enlazador peptídico comprende al menos dos aminoácidos, por ejemplo, 2,
 10 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos. En algunas modalidades, un enlazador peptídico tiene una longitud no mayor que 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 aminoácidos. En algunas modalidades, un enlazador peptídico tiene una longitud entre 2
 15 y 50, 2 y 40, 2 y 30, 2 y 20, 2 y 10, 2 y 9, 2 y 8, 2 y 7, o 2 y 6 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador peptídico comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69), LGGGSG (SEQ ID NO:70), FNRGEC (SEQ ID NO:71), VEPKSC (SEQ ID NO:72), GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82),
 20 GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83) o una combinación de estas. En algunas modalidades, el enlazador peptídico puede comprender múltiples copias de una secuencia enlazadora, por ejemplo, múltiples copias de la secuencia GGGSGGGG (SEQ ID NO:69), LGGGSG (SEQ ID NO:70), FNRGEC (SEQ ID

NO:71), VEPKSC (SEQ ID NO:72) o una combinación de estas.

En algunas modalidades, el primer y el segundo polipéptido tienen las siguientes configuraciones:

5

Primer polipéptido, configuración 1: N-VL1-VH2-bisagra-CH2-CH3-C,

10

Primer polipéptido, configuración 2: N-VH2-VL1-bisagra-CH2-CH3-C,

Configuración 1 del segundo polipéptido: N-VL2-VH1-C,

15

Configuración 2 del segundo polipéptido: N-VH1-VL2-C,

20

donde el primer enlazador entre el VL1 y VH2 del primer polipéptido o el segundo enlazador entre VL2 y VH1 del segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, dicho primer enlazador y dicho segundo enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, el primer polipéptido comprende además un tercer enlazador entre el VH2 o VL2 y la región bisagra, y el segundo polipéptido comprende además un cuarto enlazador luego de dicho VH1 o VL2 (en su

extremo C). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) y dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la

5 secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En otras modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83) y dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende

10 la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador de dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) o la secuencia de aminoácidos

15 GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO:83). En otras modalidades, dicho cuarto enlazador de dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO:82) o la secuencia de aminoácidos GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

20 (SEQ ID NO:83). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72) o la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71). En algunas modalidades, dicho cuarto enlazador comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71) o la secuencia de aminoácidos

VEPKSC (SEQ ID NO:72). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:72) y dicho cuarto enlazador comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71) La secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:71) es los últimos seis residuos de aminoácidos del dominio CL (SEQ ID NO:77) y el aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 72) incluye el último aminoácido del CH1 y los primeros cinco residuos de aminoácido de la región bisagra de SEQ ID NO:76 (como en la SEQ ID NO:5).

10

En algunas modalidades, el primer y el segundo polipéptido tienen las siguientes configuraciones:

Primer polipéptido, configuración 3: N-VL1-VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3-C,

15

Primer polipéptido, configuración 4: N-VH2-VL1-CH1-bisagra-CH2-CH3-C,

Configuración 3 del segundo polipéptido: N-VL2-VH1-CL-C,

20

Configuración 4 del segundo polipéptido: N-VH1-VL2-CL-C,

donde el primer enlazador entre dicho VL1 y VH2 del primer polipéptido o dicho segundo enlazador entre dicho VL2 y dicho

VH1 del segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, dicho primer enlazador y dicho segundo enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas 5 modalidades, dicho primer polipéptido comprende además un tercer enlazador entre dicho VH2 o dicho VL1 y dicha CH1, y dicho segundo polipéptido comprende además un cuarto enlazador entre dicho VH1 o dicho VL2 y dicha CL. En algunas modalidades, dicho tercer enlazador o dicho cuarto enlazador comprende la 10 secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto enlazador comprende un residuo de cisteína opcional. En algunas 15 modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGCGGG (SEQ ID NO:135) o LGGCGGGS (SEQ ID NO:136).

En algunas modalidades, dicha región constante de cadena pesada 20 2 (CH2) comprende una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat para un anticuerpo convencional.

En algunas modalidades, el compuesto comprende dos del primer

polipéptido y dos del segundo polipéptido. En algunas modalidades, la CH2 y la CH3 de uno de los primeros polipéptidos se asocia a la, bisagra, CH2 o CH3 del otro de los primeros polipéptidos para formar una molécula tetravalente (por ejemplo, los dos del primer polipéptido se dimerizan a través de asociaciones entre sus dominios de CH2 y CH3 de bisagra respectivos para formar una molécula tetravalente que comprende dos sitios de unión específicos para la primera proteína objetivo y dos sitios de unión específicos para la segunda proteína objetivo), un monómero o un anticuerpo monomérico como se describe en la sección de Ejemplos. Si el primer polipéptido comprende además un dominio CH1 y el segundo polipéptido comprende además un dominio CL, los dominios CH1 y CL también pueden participar en la formación de una molécula tetravalente (por ejemplo, los dos primeros polipéptidos se dimerizan a través de asociaciones entre sus dominios de bisagra, CH2 y CH3 respectivos y el CH1 de cada uno de dichos primeros polipéptidos se asocia con el CL de uno de dichos segundos polipéptidos para formar una molécula tetravalente que comprende dos sitios de unión para la primera proteína objetivo y dos sitios de unión para la segunda proteína objetivo) un monómero, un anticuerpo monomérico como se describe en la sección de Ejemplos. En algunas modalidades, los dos del primer polipéptido se asocian entre sí mediante al menos un enlace

disulfuro. En algunas modalidades, dicho compuesto comprende dos de dicho primer polipéptido y dos de dicho segundo polipéptido, donde cada uno de dicho primer polipéptido comprende un tercer enlazador, una bisagra, una CH₂ y una CH₃ y cada uno de dicho segundo polipéptido comprende un cuarto enlazador y donde la bisagra, la CH₂ y la CH₃ de uno del primer polipéptido se asocia a la bisagra, la CH₂ y la CH₃ del otro del primer polipéptido y el tercer enlazador de cada primer polipéptido se asocia al cuarto enlazador de uno de dicho segundo polipéptido para formar una molécula tetravalente (por ejemplo, un monómero, un anticuerpo monomérico como se describe en la sección de Ejemplos) (por ejemplo, compuestos U y T).

En algunas modalidades, la descripción se relaciona con un compuesto que comprende dos del primer polipéptido y dos del segundo polipéptido;

donde dichos dos del primer polipéptido se asocian entre sí mediante al menos un enlace disulfuro y donde cada uno de dicho primer polipéptido se asocia a uno de dicho segundo polipéptido mediante al menos un enlace disulfuro;

donde cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende:

(i) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específico para una primera proteína objetivo;

5 (ii) un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específico para una segunda proteína objetivo;

(iii) una región constante de cadena pesada 1 (CH1), una región
10 bisagra, una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una
región constante de cadena pesada 3 (CH3); y

donde cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende:

15 (i) un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2) específico para dicha segunda proteína objetivo;

(ii) un dominio variable de cadena pesada de la primera
20 inmunoglobulina (VH1) específico para dicha primera proteína
objetivo;

(iii) un dominio de región constante de cadena ligera (CL);

donde la bisagra, la CH2 y la CH3 de uno de los primeros polipéptidos se asocia con la bisagra, CH2 y CH3 del otro de los primeros polipéptidos y la CH1 de cada uno de dichos primeros polipéptidos se asocia con el CL de dichos segundos
5 polipéptidos para formar una molécula tetravalente;

donde

a) dichos VL1 y VH1 se asocian para formar un sitio de unión
10 que se une a dicha primera proteína objetivo;

b) dichos VL2 y VH2 se asocian para formar un sitio de unión que se une a dicha segunda proteína objetivo;

15 c) dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y ácido glutámico en la posición 256, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat; y

20 d) dicha primera proteína objetivo es BAFF y dicha segunda proteína objetivo es IL-23A o dicha primera proteína objetivo es IL-23A y dicha segunda proteína objetivo BAFF,

y donde:

(i) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:2, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:1, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

5

(ii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:2 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:1; o

10 (iii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:85, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:84, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:4; o

(iv) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende
15 la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:85 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:84; o

(v) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:87, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:86, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho
20 VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(vi) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:87 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:86; o

(vii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:89, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:88, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

5

(viii) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:89 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:88; o

10 (ix) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:91, dicho VH1 comprende la SEQ ID NO:90, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:4 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:3; o

(x) dicho VL1 comprende la SEQ ID NO:4, dicho VH1 comprende la
15 SEQ ID NO:3, dicho VL2 comprende la SEQ ID NO:91 y dicho VH2 comprende la SEQ ID NO:90.

En algunas modalidades que se relacionan con el aspecto anterior, cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende
20 además un primer enlazador entre dicho VL1 y dicho VH2 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende además un segundo enlazador entre dicho VL2 y dicho VH1. En algunas modalidades, dicho primer enlazador o dicho segundo enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas

modalidades, dicho primer enlazador y dicho segundo enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos GGGSGGGG (SEQ ID NO:69). En algunas modalidades, cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende además un tercer enlazador entre dicho

5 VH2 o dicho VL1 y dicha CH1, y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende además un cuarto enlazador entre dicho VH1 o dicho VL2 y dicha CL. En algunas modalidades, dicho tercer enlazador o dicho cuarto enlazador comprende la secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70). En algunas

10 modalidades, dicho tercer enlazador y dicho cuarto enlazador comprenden la secuencia de aminoácidos LGGGSG (SEQ ID NO:70). En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto enlazador comprende un residuo de cisteína opcional. En algunas modalidades, dicho tercer enlazador y/o dicho cuarto enlazador

15 comprenden la secuencia de aminoácidos GGCGGG (SEQ ID NO:135) o LGGCGGGS (SEQ ID NO:136). En algunas modalidades, dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) comprende una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat. En algunas modalidades,

20 la secuencia de aminoácidos de dicha región bisagra, dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) o dicha región constante de cadena pesada 3 (CH3) se obtiene a partir de IgG1 o de IgG4. En algunas modalidades, dicha región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID

NO:76), la secuencia de aminoácidos LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:130) o la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:134). En algunas modalidades, (i) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
5 SEQ ID NO:5 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; o

(ii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y cada uno de dichos
10 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o

(iii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y cada uno de dichos
15 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; o

(iv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y cada uno de dichos
20 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; o

(v) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y cada uno de dichos

segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:22; o

(vi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:26; o

(vii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:30; o

(viii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:34; o

(ix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:38; o

(x) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

5 (xi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

10 (xii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

15 (xiii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

20 (xiv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

(xv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58; o

5

(xvi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60; o

10

(xvii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62; o

15

(xviii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64; o

20

(xix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66; o

(xx) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
5 SEQ ID NO:68.

Otros aspectos de la descripción se relacionan con un compuesto que comprende dos del primer polipéptido y dos del segundo polipéptido; donde dichos dos del primer polipéptido se asocian
10 entre sí mediante al menos un enlace disulfuro y donde cada uno de dichos primeros polipéptidos se asocia a uno de dichos segundos polipéptidos mediante al menos un enlace de disulfuro; y donde (i) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y cada uno de dichos
15 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; o

(ii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y cada uno de dichos
20 segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o

(iii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y cada uno de dichos

segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:14; o

(iv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:16; o

(v) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:22; o

(vi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:26; o

(vii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y cada uno de dichos
segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO:30; o

(viii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

5 (ix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

10 (x) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

15 (xi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

20 (xii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

(xiii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

5

(xiv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

10

(xv) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58; o

15

(xvi) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60; o

20

(xvii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62; o

(xviii) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
5 SEQ ID NO:64; o

(xix) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
10 SEQ ID NO:66; o

(xx) cada uno de dichos primeros polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y cada uno de dichos segundos polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de
15 SEQ ID NO:68.

En la presente también se contemplan otros compuestos que compiten para unirse a un compuesto tal como se describe en la presente, por ejemplo, un compuesto de prueba que compite con
20 un compuesto tal como se describe en la presente para unirse a BAFF e IL23A. En algunas modalidades, el compuesto de prueba puede tener al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia (aminoácido por aminoácido en la longitud total de la secuencia) con un compuesto tal como

se describe en la presente. La unión competitiva puede determinarse mediante el uso de cualquier ensayo conocido en la técnica, por ejemplo, unión de equilibrio, ELISA, resonancia de plasmones superficiales o espectroscopía.

5

En algunas modalidades, el compuesto descrito en la presente se une específicamente a BAFF e IL23A. Un compuesto que se "une específicamente" a un antígeno o un epítipo es una expresión conocida en la técnica, y los métodos para determinar dicha unión específica también son conocidos en la técnica. Se dice que una molécula presenta "unión específica" si esta reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad a un antígeno objetivo particular que con objetivos alternativos. Un compuesto se "une específicamente" a un epítipo o antígeno objetivo si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración con respecto a su unión a otras sustancias. Por ejemplo, un compuesto que se une específicamente (o preferentemente) a un antígeno (por ejemplo, BAFF o IL23A), o un epítipo antigénico en este, es un compuesto que se une a este antígeno objetivo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración con respecto a su unión a otros antígenos u otros epítopos en el mismo antígeno. También se entiende luego de leer esta definición que, por ejemplo, un

10
15
20

compuesto que se une específicamente a un primer antígeno objetivo puede o no unirse específicamente o preferentemente a un segundo antígeno objetivo. Por lo tanto, la "unión específica" o "unión preferencial" no requieren necesariamente una unión exclusiva (aunque la pueden incluir). Generalmente, aunque no necesariamente, las referencias a la unión serán referencias a la unión preferencial. En algunos ejemplos, un compuesto que se "une específicamente" a un antígeno objetivo o un epítipo de este puede no unirse a otros antígenos u otros epítopos en el mismo antígeno.

En algunas modalidades, un compuesto tal como se describe en la presente tiene una afinidad de unión adecuada para BAFF e IL23 o los epítopos antigénicos de estos. Tal como se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o K_A . La K_A es la recíproca de la constante de disociación (K_D). El compuesto descrito en la presente puede tener una afinidad de unión (K_D) de al menos 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} M o menor para uno o ambos de los antígenos objetivo o los epítopos antigénicos. Un aumento en la afinidad de unión corresponde a una K_D disminuida. En algunas modalidades, el compuesto descrito en la presente tiene una afinidad de unión (K_D) de al menos 10^{-11} M o menor para uno o ambos de los antígenos objetivo o los epítopos antigénicos.

Una afinidad de unión mayor de un compuesto para un primer antígeno y un segundo antígeno en relación con un tercer antígeno puede indicarse mediante una K_A mayor (o un valor numérico menor de K_D) para la unión del primer antígeno y el
5 segundo antígeno que la K_A (o valor numérico de K_D) para la unión del tercer antígeno. En dichos casos, el compuesto tiene especificidad para el primer antígeno y el segundo antígeno (por ejemplo, una primera proteína en una primera conformación o un mimético de esta y una segunda proteína en una primera
10 conformación o un mimético de esta) en relación con el tercer antígeno (por ejemplo, la misma primera o segunda proteína en una segunda conformación o un mimético de esta; o una tercera proteína). Las diferencias en la afinidad de unión (por ejemplo, con respecto a la especificidad u otras comparaciones)
15 pueden ser de al menos 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10 000 o 10^5 veces.

La afinidad de unión (o especificidad de unión) puede determinarse mediante una variedad de métodos que incluyen
20 unión de equilibrio, ELISA, resonancia de plasmones superficiales o espectroscopía (por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de fluorescencia). Las condiciones de ejemplo para la evaluación de la afinidad de unión se encuentran en un amortiguador de HBS-P (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM,

tensioactivo P20 al 0.005 % (v/v)). Estas técnicas pueden utilizarse para medir la concentración de la proteína de unión unida en función de la concentración de la proteína objetivo. La concentración de la proteína de unión unida ([Unida]) está relacionada con la concentración de la proteína objetivo libre ([Libre]) y la concentración de los sitios de unión para la proteína de unión en el objetivo donde (N) es la cantidad de sitios de unión por molécula objetivo mediante la siguiente ecuación:

10

$$[Unida] = [N][Libre]/(K_d + [Libre])$$

Sin embargo, no siempre es necesario realizar una determinación exacta de la K_A , aunque, ya que algunas veces es suficiente obtener una medición cuantitativa de la afinidad, por ejemplo, determinada mediante el uso de un método tal como un análisis ELISA o FACS, es proporcional a K_A , y, por lo tanto, puede utilizarse para las comparaciones, tal como mediante la determinación de si una mayor afinidad es, por ejemplo, 2 veces mayor, obtener una medición cualitativa de la afinidad, u obtener una inferencia de la afinidad, por ejemplo, mediante la actividad en un ensayo funcional, por ejemplo, en un ensayo in vitro o in vivo.

20

En algunas modalidades, el compuesto comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido tal como se define en la Tabla 2A. En algunas modalidades, el compuesto comprende:

5 (i) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; o

(ii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
10 aminoácidos de SEQ ID NO:7 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o

(iii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y dicho segundo polipéptido
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; o

(iv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; o

20

(v) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; o

(vi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; o

5 (vii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18; o

(viii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
10 aminoácidos de SEQ ID NO:19 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; o

(ix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y dicho segundo polipéptido
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; o

(x) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; o

20

(xi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26; o

(xii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; o

(xiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30; o

(xiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

(xv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

(xvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36; o

(xvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

(xviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:39 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40; o

(xix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
5 aminoácidos de SEQ ID NO:41 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

(xx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:43 y dicho segundo polipéptido
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44; o

(xxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:45 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

15

(xxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:47 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o

20 (xxiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:49 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

(xxiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:51 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52; o

(xxv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

(xxvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

(xxvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58; o

(xxviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60; o

(xxix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62; o

(xxx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:63 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64; o

(xxxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66; o

(xxxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

Métodos de producción de compuestos, ácidos nucleicos, vectores y células

Los aspectos de la descripción también incluyen ácidos nucleicos que codifican los compuestos descritos en la presente o los polipéptidos descritos en la presente (por ejemplo el primer o segundo polipéptido descritos en la presente), que pueden codificarse juntos o separados. Pueden obtenerse los polinucleótidos que codifican los compuestos descritos en la presente o los polipéptidos descritos en la presente, y determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, mediante cualquier método conocido en la técnica.

En algunas modalidades, el ácido nucleico está comprendido dentro de un vector, tal como un vector de expresión. En algunas modalidades, el vector comprende un promotor enlazado de forma operativa al ácido nucleico.

Puede utilizarse una variedad de promotores para la expresión de los compuestos descritos en la presente o los polipéptidos descritos en la presente que incluyen, de modo no taxativo, promotor temprano intermedio de citomegalovirus (CMV), una LTR viral tal como la LTR del virus del sarcoma de Rous, HIV-LTR, HTLV-1 LTR, el promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), el promotor lac UV5 de *E. coli*, y el promotor del virus tk de herpes simple.

También pueden utilizarse promotores regulables. Dichos promotores regulables incluyen los que utilizan el represor de lac de *E. coli* como modulador de la transcripción para regular la transcripción de los promotores de células de mamífero que presentan el operador lac [Brown, M. et ál., *Cell*, 49:603-612 (1987)], los que utilizan el represor de la tetraciclina (tetR) [Gossen, M., y Bujard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89:5547-5551 (1992); Yao, F. et ál., *Human Gene Therapy*, 9:1939-1950 (1998); Shockelt, P., et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*,

92:6522-6526 (1995)]. Otros sistemas incluyen el dímero FK506, VP16 o p65 y el uso de astradiol, RU486, murislerona de difenol, o rapamicina. Los sistemas inducibles se encuentran disponibles en Invitrogen, Clontech y Ariad.

5

Pueden utilizarse promotores regulables que incluyen un represor con el operón. En una modalidad, el represor de lac de *Escherichia coli* puede funcionar como un modulador de la transcripción para regular la transcripción de los promotores de células de mamífero que presentan el operador lac [M. Brown et ál., *Cell*, 49:603-612 (1987)]; Gossen y Bujard (1992); [M. Gossen et ál., *Nati. Acad. Sci. EUA*, 89:5547-5551 (1992)], combinar el represor de tetraciclina (tetR) con el activador de la transcripción (VP 16) para crear una proteína de fusión de tetR-activador de la transcripción en células de mamíferos, tTa (tetR-VP 16), con el promotor mínimo que presenta tetO obtenido a partir del promotor temprano inmediato mayor del citomegalovirus humano (hCMV) para crear un sistema de operadores tetR-tet para controlar la expresión génica en células de mamífero. En una modalidad, se utiliza un cambio inducible con tetraciclina (Yao et ál., *Human Gene Therapy*; Gossen et ál., *Nati. Acad. Sci. EUA*, 89:5547-5551 (1992); Shockett et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 92:6522-6526 (1995)).

10
15
20

Además, el vector puede contener, por ejemplo, alguno o todos de los siguientes: un gen marcador seleccionable, tal como el gen de neomicina para la selección de transfectantes estables
5 o transitorios en células de mamífero; secuencias potenciadoras/promotoras del gen temprano inmediato de CMV humano para niveles de transcripción altos; señales de procesamiento de ARN y terminación de la transcripción de SV40 para la estabilidad del ARNm; orígenes la replicación del
10 poliovirus de SV40 y ColE1 para la replicación episomal adecuada; sitios de unión internos del ribosoma (IRES), sitios de clonación múltiples versátiles; promotores del ARN T7 y SP6 para la transcripción in vitro de ARN sentido y antisentido. Los vectores y los métodos adecuados para producir vectores
15 son conocidos y se encuentran disponibles en la técnica.

Puede transferirse un vector de expresión que comprende el ácido nucleico a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección
20 liposómica y precipitación de calcio y fosfato) y, luego, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir los compuestos descritos en la presente. En algunas modalidades, se regula la expresión de los compuestos descritos en la presente mediante un promotor

constitutivo, inducible o específico del tejido.

Las células hospedadoras utilizadas para expresar los compuestos descritos en la presente o los polipéptidos descritos en la presente pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferentemente, células eucariotas. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento de promotor génico temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano forman un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foecking et ál., (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors," *Gene* 45:101-106; Cockett et ál. (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hámster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification," *Biotechnology* 8:662-667).

También puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión del hospedador para expresar los compuestos descritos en la presente o los polipéptidos descritos en la presente. Dichos sistemas de expresión de hospedador representan vehículos mediante los cuales pueden producirse y, posteriormente, purificarse las secuencias de codificación de los compuestos descritos en la presente o los polipéptidos

descritos en la presente, pero también representan células que pueden expresar los compuestos descritos en la presente in situ, cuando se las transforma o transfecta con las secuencias de codificación de nucleótidos adecuadas. Estos incluyen, de modo no taxativo, microorganismos tales como bacteria (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriofagos recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias de codificación para los compuestos descritos en la presente; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican los compuestos descritos en la presente; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baclovirus) que contienen las secuencias que codifican los compuestos descritos en la presente; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen las secuencias que codifican las moléculas y los compuestos descritos en la presente; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfáticas (ver, la patente estadounidense n.º 5,807,715),

células Per C.6 (células retinianas humanas desarrolladas por Crucell) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen los promotores obtenidos a partir del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o a partir de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vacuna).

En los sistemas bacterianos, puede seleccionarse una cantidad de vectores de expresión de manera favorable dependiendo del uso previsto del compuesto que se expresa. Por ejemplo, cuando se debe producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de los compuestos descritos en la presente, pueden ser convenientes los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que pueden purificarse fácilmente. Dichos vectores incluyen, de modo no taxativo, el vector de expresión pUR278 de *E. coli*. (Rüther et ál. (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones," EMBO J. 2:1791-1794), en el cual la secuencia de codificación de anticuerpo puede estar ligada de manera individual en el vector, en el mismo marco de lectura que la región de codificación de lac Z, de modo tal que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye et ál. (1985) "Up-Promoter Mutations In The lpp Gene Of Escherichia Coli,"

Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke et ál. (1989)

"Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia Coli," J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También

pueden utilizarse vectores pGEX para expresar polipéptidos

5 extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa

(GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y

pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas

mediante adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-

agarosa, seguida de elución en presencia de glutatión libre.

10 Los vectores pGEX se diseñan para incluir trombina o sitios de

escisión de proteasa de factor Xa de forma tal que el producto

del gen objetivo clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, el virus de polihedrosis nuclear

15 Autographa californica (AcNPV) se usa como un vector para

expresar genes extraños. El virus crece en células Spodoptera

frugiperda. La secuencia de codificación puede clonarse de

manera individual en regiones no esenciales (por ejemplo, el

gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de

20 un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células hospedadoras de mamífero, puede utilizarse una

cantidad de sistemas de expresión basados en virus. En los

casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de

expresión, la secuencia de codificación de interés puede estar

ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico se puede insertar luego en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) producirá un virus recombinante viable y capaz de expresar la molécula de la inmunoglobulina en hospedadores infectados (por ejemplo, ver Logan et ál. (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection," Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81:3655-3659). También pueden necesitarse señales de inicio específicas para la traducción eficaz de secuencias de codificación de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en la misma fase que el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de toda la inserción. Estos codones de inicio y señales de control de traducción exógena pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción y terminadores de la transcripción apropiados, etc. (véase, Bitter et ál., (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast," Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, se puede elegir una cepa de célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto genético en la forma específica deseada.

5 Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Por ejemplo, en determinadas modalidades, los compuestos descritos en la presente pueden expresarse como un único producto génico

10 (por ejemplo, una única cadena de polipéptidos, es decir, como un precursor de poliproteína), que requiere escisión proteolítica mediante mecanismos celulares recombinantes o naturales para formar polipéptidos separados de los compuestos descritos en la presente. Por lo tanto, la descripción

15 comprende la modificación genética de una secuencia de ácidos nucleicos para codificar una molécula precursora de poliproteína que comprende los polipéptidos de los compuestos descritos en la presente, que incluye secuencias de codificación capaces de dirigir la escisión postraducciona

20 l de dicho precursor de poliproteína. La escisión postraducciona del precursor de poliproteína produce los polipéptidos de los compuestos descritos en la presente. La escisión postraducciona de la molécula precursora que comprende los polipéptidos de los compuestos descritos en la presente puede

producirse *in vivo* (es decir, dentro de la célula hospedadora mediante sistemas/mecanismos celulares recombinantes o naturales, por ejemplo, escisión de furina en un sitio adecuado) o puede producirse *in vitro* (por ejemplo incubación de dicha cadena de polipéptidos en una composición que comprende proteasas o peptidasas de actividad conocida y/o en una composición que comprende condiciones o reactivos conocidos para promover la acción proteolítica deseada). En la técnica se conocen la purificación y la modificación de las proteínas recombinantes de modo tal que el diseño del precursor de poliproteína puede incluir una cantidad de modalidades fácilmente comprendidas por un experto. Puede utilizarse cualquier proteasa o peptidasa conocida en la técnica para la modificación descrita de la molécula precursora, por ejemplo, trombina o el factor Xa (Nagai et ál. (1985) "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli," Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 82:7252-7255, y revisado en Jenny et ál. (2003) A« Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa», Protein Expr. Purif. 31:1-11, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia)), enterocinasa (Collins-Racie et ál. (1995) "Production Of Recombinant Bovine" "Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion

Partner DsbA", Biotechnology 13:982-987, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia)), furina y AcTEV (Parks et ál. (1994) «Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase», 5 Anal. Biochem. 216:413-417, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia)) y la proteasa C3 del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa.

Las distintas células hospedadoras tienen características y 10 mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación postraducción de proteínas y productos genéticos. Las líneas celulares o los sistemas hospedadores apropiados se pueden elegir de modo de asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña. Con este fin, las células 15 hospedadoras eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, glicosilación y fosforilación del producto genético se puede usar. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, de modo no taxativo, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, 20 WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse genéticamente líneas celulares que

expresan de manera estable los compuestos descritos en la presente. En vez de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, las células hospedadoras se pueden transformar con ADN controlado por
5 elementos de control de expresión adecuados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Luego de la introducción del ADN extraño, puede permitirse que las células modificadas crezcan durante 1-2 días
10 en un medio enriquecido y luego cambiarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante otorga resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez se pueden
15 clonar y expandir en líneas celulares. Este método puede usarse de manera favorable para modificar genéticamente las líneas celulares que expresan los compuestos descritos en la presente. Dichas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en la detección y la evaluación de compuestos que
20 interactúan directa o indirectamente con los compuestos descritos en la presente.

Puede utilizarse una cantidad de sistemas de selección que incluyen, de modo no taxativo, la timidina cinasa del virus

del herpes simple (Wigler et ál. (1977) «Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells», Cell 11: 223-232), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska et ál. (1992) "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy", Bioessays 14: 495-500), y genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et ál. (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene", Cell 22: 817-823), dichos genes pueden utilizarse en células tk-, hgprrt- o aprt-, respectivamente. Además, puede utilizarse la resistencia anti-metabolito como criterio de selección de los siguientes genes: dhfr, que otorga resistencia al metotrexato (Wigler et ál., (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77:3567-3570; O'Hare et ál. (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase," Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 78: 1527-1531); gpt, que otorga resistencia al ácido micofenólico (Mulligan et ál. (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase", Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 78: 2072-2076); neo, que otorga resistencia al aminoglicósido G-

418 (Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Triáis
 And Future Directions", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-
 596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy",
 Science 260:926-932; y Morgan et ál. (1993) "Human Gene
 5 Therapy", Ann. Rev. Biochem. 62:191-217) e hygro, que otorga
 resistencia a la higromicina (Santerre et ál. (1984)
 "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418
 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells",
 Gene 30:147-156). Los métodos comúnmente conocidos en la
 10 técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar
 se describen en Ausubel et ál. (eds.), 1993, Current Protocols
 in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990,
 Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton
 Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et ál. (eds),
 15 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons,
 NY.; Colberre-Garapin et ál. (1981) "A New Dominant Hybrid
 Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells", J. Mol. Biol.
 150:1-14.

20 Los niveles de expresión de los compuestos descritos en la
 presente o los polipéptidos descritos en la presente se pueden
 aumentar mediante la amplificación de vectores (para acceder a
 una revisión, ver Bebbington y Hentschel, The use of vectors
 based on gene amplification for the expression of cloned genes

in mammalian cells en DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador en el sistema que expresa un compuesto descrito en la presente es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de una célula hospedadora aumentará la cantidad de copias del gen marcador. Debido a que la región amplificable se asocia a la secuencia de nucleótidos de un compuesto descrito en la presente o un polipéptido descrito en la presente, también aumentará la producción del polipéptido (Crouse et ál. (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes", Mol. Cell. Biol. 3:257-266).

La célula hospedadora puede transfectarse conjuntamente con dos vectores de expresión, de los cuales el primer vector codifica el primer polipéptido de un compuesto descrito en la presente y el segundo vector codifica el segundo polipéptido de un compuesto descrito en la presente. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de ambos polipéptidos. De manera alternativa, puede utilizarse un único vector que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias de codificación para los polipéptidos de los compuestos descritos en la presente pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que un compuesto descrito en la presente o un polipéptido descrito en la presente se haya expresado de manera recombinante, este puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o anticuerpos (por ejemplo, análogos de los esquemas de purificación de anticuerpos en función de la selectividad de antígenos), por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, mediante afinidad, particularmente, mediante afinidad para el antígeno específico (opcionalmente después de la selección de proteína A en la que el compuesto comprende un dominio de Fe (o una parte de este)), y en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de polipéptidos o anticuerpos.

Otros aspectos de la descripción se refieren a una célula que comprende un ácido nucleico descrito en la presente o un vector descrito en la presente. La célula puede ser una célula procariota o eucariota. En algunas modalidades, la célula es una célula de mamífero. En la presente se describen tipos celulares ilustrativos.

Aun otros aspectos de la descripción se refieren a un método para producir un compuesto descrito en la presente o un polipéptido descrito en la presente (por ejemplo, un primer polipéptido o un segundo polipéptido), donde el método
5 comprende obtener una célula descrita en la presente y expresar un ácido nucleico descrito en la presente en dicha célula. En algunas modalidades, el método comprende además aislar y purificar un compuesto descrito en la presente o un polipéptido descrito en la presente.

10

Métodos de tratamiento y composiciones para su uso en la medicina

Otros aspectos de la descripción se refieren a métodos de
15 tratamiento y composiciones para su uso en la medicina. Los ejemplos no taxativos de compuestos para uso en dichos métodos y composiciones son los que comprenden:

(i) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
20 aminoácidos de SEQ ID NO:5 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; o

(ii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o

(iii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; o

(iv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; o

10

(v) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; o

15 (vi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; o

(vii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18; o

(viii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; o

(ix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; o

(x) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; o

10

(xi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26; o

15 (xii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; o

(xiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30; o

(xiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

(xv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

(xvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36; o

10

(xvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

15 (xviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40; o

(xix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

(xx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44; o

(xxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

(xxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o

10

(xxiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

15 (xxiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52; o

(xxv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

(xxvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

(xxvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y dicho segundo polipéptido

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58; o

(xxviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60; o

10

(xxix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62; o

15 (xxx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64; o

(xxxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y dicho segundo polipéptido
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66; o

(xxxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y dicho segundo polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

En algunas modalidades, el método de tratamiento o el uso es un método para tratar una enfermedad autoinmuntaria o inflamatoria o su uso en dicho método. En algunas modalidades, el método comprende administrar un compuesto descrito en la presente o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que padece, o en riesgo de padecer, una enfermedad autoinmuntaria o inflamatoria.

El sujeto que se tratará mediante los métodos descritos en la presente puede ser un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Los mamíferos incluyen, de modo no taxativo, animales de granja, animales para deportes, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas. Un sujeto humano que necesita el tratamiento puede ser un sujeto humano que padece, en riesgo de padecer, o del cual se sospecha que padece, una enfermedad. Un sujeto que padece una enfermedad puede identificarse mediante exámenes médicos de rutina, por ejemplo, un examen físico, una prueba de laboratorio, una prueba funcional de los órganos, una tomografía computarizada o un ultrasonido. Un sujeto del cual se sospecha que padece cualquiera de dichas enfermedades puede mostrar uno o más

síntomas de la enfermedad. Los signos y los síntomas de las enfermedades, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, son conocidos por los expertos en la técnica. Un sujeto en riesgo de padecer la enfermedad puede ser un
5 sujeto que presenta uno o más de los factores de riesgo de esa enfermedad.

Los ejemplos no taxativos de enfermedades autoinmunitarias incluyen lupus nefrítico (LN) (lupus eritematoso sistémico
10 (SLE) con compromiso renal), lupus eritematosos sistémico (SLE), síndrome de Sjogren primario (pSS), enfermedad de Sjorgren, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) (por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped crónica (cGVHD)), esclerosis sistémica (SSc), vasculitis asociada con anticuerpo
15 autocitoplasma de neutrófilos (ANCA) (AAV), artritis reumatoide, soriasis, diabetes tipo 1, lupus eritematoso sistémico, rechazo al trasplante, enfermedad tiroide autoinmunitaria (enfermedad de Hashimoto), sacoidosis, escleroderma, vasculitis granulomatosa, enfermedad de Crohn,
20 colitis ulcerativa, enfermedad de Sjogren, espondilitis anquilosante, artritis soriática, dermatomiositis, polimiositis, poliateritis nodosa, enfermedades de la piel ampollares mediadas de forma inmunológica, síndrome de Behcet, esclerosis múltiple, enfermedad de Goodpasture o

glomerulonefritis mediada por inmunidad.

Los ejemplos no taxativos de enfermedades inflamatorias incluyen, artritis reumatoide, psoriasis, lupus sistémico
5 eritematoso, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad autoinmunitaria de Addison, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, síndrome linfoproliferativo inmunitario (ALPS), púrpura
10 trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, celiaquía-dermatitis, síndrome de inmunodeficiencia por fatiga crónica (CFIDS), polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, penfigoide cicatricial, enfermedad de las aglutininas frías,
15 síndrome de Crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Dego, dermatomiasitis, dermatomiositis - juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia esencial mixta, fibromialgia - fibromiositis, enfermedad de Graves, enfermedad de guillain-barre, tiroiditis de hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura
20 trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes insulín dependiente (Tipo I), artritis juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conjuntivo mixta, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes

poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveitis, vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener. En algunas modalidades, la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria es enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica.

Para poner en práctica un método descrito en la presente, puede administrarse una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica descrito en la presente a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que necesita el tratamiento. Se conocen diversos sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar los compuestos de la invención. Los métodos de administración incluyen, de modo no taxativo, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos de la tecnología objeto pueden administrarse, por ejemplo, mediante infusión, bolo o inyección y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos tales como agentes antiinflamatorios. La administración puede ser sistémica o local. En modalidades

preferidas, la administración se realiza mediante inyección subcutánea. Las formulaciones para dichas inyecciones pueden prepararse, por ejemplo, en jeringas llenas previamente que pueden administrarse una vez cada dos semanas.

5

Una "cantidad eficaz", tal como se usa en la presente, se refiere a la cantidad de cada compuesto necesaria para otorgar un efecto terapéutico sobre el sujeto, ya sea solo o en combinación con uno o más de otros compuestos. Las cantidades
10 eficaces varían, tal como lo reconocerán los expertos en la técnica, dependiendo de la afección particular que se trata, la gravedad de la afección, los parámetros del sujeto individual que incluyen, edad, condición física, talla, género, peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia
15 actual (si la hubiere), la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional de la salud. Estos factores son conocidos para los expertos en la técnica y pueden abordarse únicamente mediante el uso de la experimentación habitual. Generalmente,
20 se prefiere que se utilice una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de estos, es decir, la mayor dosis segura de acuerdo con la opinión médica bien fundada. Los expertos en la técnica comprenderán, sin embargo, que un sujeto puede insistir con una dosis menor o una dosis tolerable por

razones médicas, razones psicológicas o virtualmente por cualquier otra razón.

Las consideraciones empíricas, tales como la semivida,
5 generalmente contribuirán con la determinación de la dosificación. Por ejemplo, pueden utilizarse compuestos compatibles con el sistema inmunitario humano, tales como los compuestos que comprenden regiones de anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos completos, para prolongar la semivida
10 del compuesto y para impedir que el compuesto sea atacado por el sistema inmunitario del hospedador. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse durante el transcurso de la terapia y, generalmente, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o la supresión y/o
15 mejora y/o demora de una enfermedad. De manera alternativa, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación continua sostenida. En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

20 En algunas modalidades, la dosificación es diaria, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días o cada seis días. En algunas modalidades, la frecuencia de dosificación es todas las semanas, cada 2 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada

8 semanas, cada 9 semanas o cada 10 semanas; o una vez al mes, cada 2 meses o cada 3 meses o mayor. La evolución de esta terapia puede monitorearse fácilmente mediante ensayos y técnicas convencionales. El régimen de dosificación (que
5 incluye el compuesto utilizado) puede variar con el transcurso del tiempo.

En algunas modalidades, para un sujeto adulto de peso normal, pueden administrarse dosis que oscilan de alrededor de 0.01 a
10 1000 mg/kg. En algunas modalidades, la dosis es de entre 1 a 200 mg. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, la sincronización y la repetición, dependerá del sujeto particular y el historial médico de dicho sujeto, así como de las propiedades del compuesto (tal como la semivida del
15 compuesto y otras consideraciones conocidas en la técnica).

A los efectos de la presente descripción, la dosificación adecuada de un compuesto tal como se describe en la presente dependerá del compuesto específico empleado (o las
20 composiciones de este), la formulación y la vía de administración, el tipo y la gravedad de la enfermedad, si el compuesto se administra a efectos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del sujeto y la respuesta al antagonista, y el criterio del médico tratante.

Usualmente, el médico administrará un compuesto hasta alcanzar una dosificación que logre el resultado deseado. La administración de uno o más compuestos puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, de si el objetivo de la administración es terapéutico o profiláctico, y de otros factores conocidos para los profesionales expertos. La administración de un compuesto puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis separadas, por ejemplo, ya sea antes, durante o después del desarrollo de una enfermedad.

Tal como se usa en la presente, el término «tratar» se refiere a la aplicación o la administración de un compuesto o una composición que incluye el compuesto a un sujeto que padece una enfermedad, un síntoma de la enfermedad o una predisposición a la enfermedad, a los efectos de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, recuperar, mejorar o afectar la enfermedad, el síntoma de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

Aliviar una enfermedad incluye retrasar el desarrollo o la evolución de la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad. Aliviar la enfermedad no requiere necesariamente

resultados curativos. Tal como usa en la presente, "retrasar" el desarrollo de una enfermedad significa diferir, dificultar, enlentecer, demorar, estabilizar y/o posponer la evolución de la enfermedad. Esta demora puede tener extensiones de tiempo variables, dependiendo del historial de la enfermedad y/o el individuo en tratamiento. Un método que "retrasa" o alivia el desarrollo de una enfermedad, o retrasa la aparición de la enfermedad, es un método que reduce la probabilidad de desarrollar uno o más síntomas de la enfermedad en un marco de tiempo dado y/o reduce la extensión de los síntomas en un marco de tiempo dado, en comparación con el no uso del método. Dichas comparaciones se basan usualmente en estudios clínicos, que utilizan una cantidad de sujetos suficiente para proporcionar un resultado estadísticamente significativo.

15

"Desarrollo" o "evolución" de una enfermedad significa las manifestaciones iniciales y/o la subsiguiente evolución de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad puede detectarse y evaluarse mediante el uso de técnicas clínicas estándar, tal como se conoce en la técnica. Sin embargo, el desarrollo también se refiere a la evolución de que puede ser indetectable. A los efectos de la presente descripción, el desarrollo o la evolución se refieren al transcurso biológico de los síntomas. El "desarrollo" incluye la ocurrencia,

20

recurrencia y aparición. Tal como se usa en la presente, la "aparición" o la "ocurrencia" de una enfermedad incluye la aparición inicial y/o la recurrencia.

- 5 En algunas modalidades, el compuesto descrito en la presente se administra a un sujeto que necesita el tratamiento en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de uno o ambos de BAFF o IL23A mediante al menos 20 % (por ejemplo, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) in vivo o in vitro.
- 10 Los métodos para determinar la capacidad inhibidora de un compuesto son conocidos en la técnica. En los Ejemplos se proporcionan ensayos de inhibición de BAFF e IL23A ilustrativos.
- 15 Pueden utilizarse métodos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica de la medicina, para administrar el compuesto o la composición farmacéutica al sujeto, dependiendo del tipo de enfermedad que se tratará o el sitio de la enfermedad. Esta composición también puede administrarse
- 20 mediante otras vías convencionales, por ejemplo, mediante administración oral, parenteral, inhalación de atomización, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. Tal como se usa en la presente, el término "parenteral" incluye técnicas de inyección o infusión

subcutáneas, intracutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarticulares, intraarteriales, intrasinoviales, intraesternales, intratecales, intralesionales e intracraneales. Además esta puede administrarse al sujeto
5 mediante vía de administración de depósito inyectable tal como mediante el uso de métodos y materiales biodegradables o inyectables con un depósito de 1, 3 o 6 meses.

Composiciones farmacéuticas

10

Aun otros aspectos de la descripción se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto descrito en la presente. Puede administrarse una composición que comprende un compuesto de la tecnología sujeto (por
15 ejemplo, compuestos específicos para BAFF e IL23A) a un sujeto que padece o se encuentra en riesgo de padecer una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. La tecnología objeto proporciona además el uso de un compuesto de la tecnología sujeto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento
20 de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. Los compuestos pueden administrarse solos o en combinación con otras composiciones en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. Los ejemplos no taxativos de los compuestos de la tecnología sujeto para su

uso en dichas composiciones farmacéuticas son los que comprenden:

(i) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; o

(ii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o

(iii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; o

(iv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; o

(v) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; o

(vi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:15 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; o

(vii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y dicho segundo polipéptido
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18; o

(viii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y dicho segundo polipéptido
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; o

(ix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; o

15

(x) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; o

20 (xi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26; o

(xii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:27 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; o

(xiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
5 aminoácidos de SEQ ID NO:29 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30; o

(xiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:31 y dicho segundo polipéptido
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

(xv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:33 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; o

15

(xvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:35 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36; o

20 (xvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:37 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; o

(xviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:39 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40; o

(xix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
5 aminoácidos de SEQ ID NO:41 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42; o

(xx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:43 y dicho segundo polipéptido
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44; o

(xxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:45 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46; o

15

(xxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:47 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o

20 (xxiii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:49 y dicho segundo polipéptido
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; o

(xxiv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:51 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52; o

(xxv) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54; o

(xxvi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56; o

(xxvii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58; o

15

(xxviii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60; o

(xxix) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62; o

(xxx) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:63 y dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64; o

(xxxi) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y dicho segundo polipéptido
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66; o

(xxxii) dicho primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y dicho segundo polipéptido
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

Tal como se usa en la presente, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a la formulación de un compuesto descrito en la presente en combinación con un portador
15 farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además agentes adicionales (por ejemplo, para su administración específica, para aumentar la semivida u otros compuestos terapéuticos).

20 Tal como se usa en la presente, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable", se refiere a un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno sólido o líquido, diluyente, excipiente, auxiliar de fabricación (por ejemplo, lubricante, magnesio en talco,

estearato de cinc o calcio o ácido esteárico) material de encapsulación de solvente, implicado en el transporte o el traslado del compuesto desde un sitio del cuerpo (por ejemplo, el sitio de administración) hacia otro sitio (por ejemplo, 5 órgano, tejido o parte del cuerpo). Un portador farmacéuticamente aceptable es "aceptable" en el sentido de que es compatible con los otros ingredientes de la formulación y de que no daña el tejido del sujeto (por ejemplo, fisiológicamente compatible, estéril, pH fisiológico, etc.).

10 Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tal como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, 15 metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras supositorias; (9) aceites, 20 tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (12) ésteres, tales como

oleato de etilo y laurato de etilo; (13) ágar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógeno; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadoras de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes espesantes, tales como polipéptidos y aminoácidos; (23) componente en suero, tal como albúmina en suero, HDL y LDL; (22) alcoholes C2-C12, tal como etanol y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas, como composiciones utilizadas en formulaciones farmacéuticas. En la formulación, también pueden estar presentes agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes endulzantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes. Las expresiones tales como "excipiente", "portador", "portador farmacéuticamente aceptable" o similares se utilizan en forma indistinta en la presente.

En algunas modalidades, se administra un compuesto de la tecnología sujeto en una composición mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, donde el implante es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye una membrana, tal como una

membrana sikalastic, o una fibra. Típicamente, cuando se administra la composición, los materiales se utilizan materiales que no absorben el compuesto de la tecnología sujeto.

5

En otras modalidades, los compuestos de la tecnología sujeto se administran en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, puede utilizarse una bomba (ver, por ejemplo, Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et ál., 1980, Surgery 88:507; Saudek et ál., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra modalidad, pueden utilizarse materiales poliméricos. (Ver, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release (Langer y Wise eds., CRC Press, Boca Ratón, Fla., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen y Ball eds., Wiley, Nueva York, 1984); Ranger y Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61. Ver, también, Levy et ál., 1985, Science 228:190; During et ál., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et ál., 1989, J. Neurosurg. 71:105). Otros sistemas de liberación controlada se describen, por ejemplo, en Langer, supra.

15

20

Los compuestos de la tecnología sujeto pueden administrarse como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad

terapéuticamente eficaz de un agente de unión y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles.

En modalidades típicas, la composición farmacéutica se formula
5 de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa o subcutánea a un sujeto, por ejemplo, un ser humano. Usualmente, las composiciones para administración mediante inyección son soluciones en un amortiguador acuoso isotónico estéril. En los
10 casos que sea necesario, el producto farmacéutico también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se proporcionan ya sea por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por
15 ejemplo, como un polvo liofilizado o un concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sachet que indique la cantidad de agente activo. En los casos en los que el producto farmacéutico deba administrarse por infusión, puede dosificarse con un frasco de infusión que
20 contenga agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. En los casos en los que el producto farmacéutico se administre por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua esterilizada para inyección o solución salina de modo tal que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Una composición farmacéutica para administración sistémica puede ser un líquido, por ejemplo, solución salina estéril, solución de Hank o Ringer lactada. Además, la composición
5 farmacéutica puede encontrarse en forma sólida y volver a disolverse o suspenderse inmediatamente antes de utilizarse. También se contemplan las formas liofilizadas.

La composición farmacéutica puede estar contenida dentro de
10 una vesícula o partícula lipídica, tal como un liposoma o microcristal, que también es adecuado para la administración parenteral. Las partículas pueden tener cualquier estructura adecuada, tal como unilamelares o plurilamelares, siempre que las composiciones se encuentren contenidas en estas. Los
15 compuestos pueden estar atrapados en "partículas lipídicas de plásmido estabilizadas" (SPLP) que contienen el lípido fusogénico dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), bajos niveles (5-10 mol%) de lípido catiónico, y se encuentran estabilizadas con un recubrimiento de polietilenglicol (PEG)
20 (Zhang Y. P. et ál., Gene Ther. 1999, 6:1438-47). Dichas vesículas o partículas prefieren particularmente los lípidos cargados positivamente, tales como N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amoniometilsulfato, o "DOTAP". La preparación de dichas partículas de lípidos es

ampliamente conocida. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 4.880.635; 4.906.477; 4.911.928; 4.917.951; 4.920.016 y 4.921.757.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse o envasarse como una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria", cuando se utiliza en referencia a una composición farmacéutica de la presente descripción, se refiere a unidades separadas físicamente
10 adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto, en las que cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, junto con el diluyente necesario, es decir, portador o vehículo.

15

En algunas modalidades, un compuesto descrito en la presente puede estar conjugado con un resto terapéutico, por ejemplo, un agente antiinflamatorio. Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos con polipéptidos, que incluyen dominios
20 Fc, son conocidas; ver, por ejemplo, Amon et ál., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cáncer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et ál. (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et ál., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug

Delivery (2^a Ed.), Robinson et ál. (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cáncer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et ál. (eds.), 1985, págs. 475-506); !Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cáncer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et ál. (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; y Thorpe et ál. (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-158.

Además, la composición farmacéutica puede proporcionarse como un kit farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene el compuesto de la tecnología sujeto en una forma liofilizada y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua esterilizada) para inyección. El diluyente farmacéuticamente aceptable puede utilizarse para la reconstrucción o la dilución del compuesto liofilizado de la tecnología sujeto. En asociación con dicho o dichos recipientes se puede incluir una nota de la forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte

del organismo con respecto a la fabricación, el uso o la venta para administración a humanos.

En otro aspecto, se incluye un artículo de fabricación que
5 contiene materiales útiles para el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente. En algunas modalidades, el artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los contenedores
10 se podrán formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunas modalidades, el recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de una enfermedad descrita en la presente y puede tener un puerto de acceso esterilizado. Por ejemplo, el recipiente puede tener
15 un vial o una bolsa de solución intravenosa con un tapón que pueda perforarse con una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es un compuesto de la tecnología sujeto. En algunas modalidades, la etiqueta que se encuentra en el recipiente o se asocia a este indica que la
20 composición se utiliza para tratar la enfermedad elegida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo contenedor que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. Puede incluir además

otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

5

Sin ahondar en detalles, se cree que un experto en la técnica puede, en función de la descripción anterior, utilizar la presente descripción en la mayor medida posible. Las siguientes modalidades específicas se interpretarán, por lo tanto, como
10 meramente ilustrativas, y no se limitan al resto de la descripción de ningún modo. Todas las publicaciones citadas en la presente se incorporan mediante referencia a los efectos de la materia a la que se hace referencia en la presente.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Construcción de compuestos ilustrativos que se dirigen a IL23A y BAFF

20

Los compuestos de la tecnología sujeto se produjeron mediante métodos recombinantes conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, las publicaciones de PCT WO 2006/113665, WO 2008/157379 y WO 2010/080538, los contenidos de las cuales se incorporan a la presente mediante referencia). La Tabla 2A a

continuación proporciona compuestos ilustrativos que se unen a IL23A y BAFF que se utilizaron en los Ejemplos siguientes. En resumen, los plásmidos que codifican el primer y el segundo polipéptido para cada compuesto se transfectaron juntos en

5 células CHO-S mediante el uso del reactivo FreeStyle MAX (CHO). Las células se cultivaron durante 13-14 días y los compuestos producidos por las células se purificaron mediante el uso de cromatografía de proteína A. Los compuestos se purificaron

10 adicionalmente mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño.

Tabla 2A. Compuestos de unión a IL23A y BAFF ilustrativos

ID del Compuesto	vL de cadena larga	vH de cadena larga	vL de cadena corta	vH de cadena corta	3.er o 4° tipo de enlaz ador	Isotip o de domini o consta nte	SEQ ID NO: (1.er/ 2° polipé ptido)
Compuesto E	BAFF(1) VL (SEQ ID NO:2)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	IL23A(1)) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF(1) VH (SEQ ID NO:1)	LGGGS G (SEQ ID NO:70)	IgG1KO -YTE (SEQ ID NO:128)	5/6
Compuesto V	IL23A(1)) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF(1) VH (SEQ ID NO:1)	BAFF(1) VL (SEQ ID NO:2)	IL23A(1)) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGS G (SEQ ID NO:70 NO:128	IgG1KO -YTE (SEQ ID NO:128	7/8

5	Compu esto U	BAFF(1) VL (SEQ ID NO:2)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF(1) VH (SEQ ID NO:1)	E(C-1) (SEQ ID NO:82) , K- coil(C -1) (SEQ ID NO:83)	Fc- IgG1K O-YTE (SEQ ID NO:12 9)	9/10
10	Compu esto T	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF(1) VH (SEQ ID NO:1)	BAFF(1) VL (SEQ ID NO:2)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C-1) (SEQ ID NO:82) , K- coil(C -1) (SEQ ID NO:83)	Fc- IgG1K O-YTE (SEQ ID NO:12 9)	11/12

15

20

5

Compuesto	BAFF(1)	IL23A(	IL23A(1	BAFF(1)	LGGGS	IgG4-	13/14
X	VL (SEQ	1) VH	) VL	VH (SEQ	G	Pro-YTE	
	ID	(SEQ	(SEQ ID	ID	(SEQ	(SEQ ID	
	NO:2)	ID	NO:4)	NO:1)	ID	NO: 74)	
		NO:3)			NO:		
					70)		
Compuesto	IL23A(1	BAFF(1	BAFF(1)	IL23A(1	LGGGS	IgG4-	15/16
F	) VL	) VH	VL (SEQ	) VH	G	Pro-YTE	
	(SEQ ID	(SEQ	ID	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	
	NO:4)	ID	NO:2)	NO:3)	ID	NO: 74)	
		NO:1)			NO:		
					70)		
Compuesto	BAFF(1)	IL23A(	IL23A(1	BAFF(1)	E(C-	Fc-	17/18
W	VL (SEQ	1) VH	) VL	VH (SEQ	1)	IgG4-	
	ID	(SEQ	(SEQ ID	ID	(SEQ	Pro-YTE	
	NO:2)	ID	NO:4)	NO:1)	ID	(SEQ ID	
		NO:3)			NO:82	NO:127)	
					), K-		
					coil(		
					C-1)		
					(SEQ		
					ID		
					NO:83		
					)		

10

15

20

Compuesto	IL23A(1	BAFF(1	BAFF(1)	IL23A(1	E(C-	Fc-	19/2
S	) VL	) VH	VL (SEQ	) VH	1)	IgG4-	0
	(SEQ ID	(SEQ	ID	(SEQ ID	(SEQ	Pro-YTE	
	NO:4)	ID	NO:2)	NO:3)	ID	(SEQ ID	
		NO:1)			NO:82	NO:127)	
					), K-		
					coil(		
					C-1)		
					(SEQ		
					ID		
					NO:83		
					)		
Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	LGGS	IgG1KO-	21/2
G	) VL	(4) VH	(4) VL	) VH	G	YTE (SEQ	2
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	ID	
	NO:4)	ID	NO: 85)	NO:3)	ID	NO:128)	
		NO:84)			NO:		
					70)		

5

10

15

20

Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	E(C-	Fc-	23/2
AA	) VL	(4) VH	(4) VL	) VH	1)	IgG1KO-	4
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	YTE (SEQ	
	NO:4)	ID	NO: 85)	NO:3)	ID	ID	
		NO:84)			NO:82	NO:129)	
					), K-		
					coil(		
					C-1)		
					(SEQ		
					ID		
					NO:83		
					)		
Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	LGGGS	IgG4-	25/2
I	) VL	(4) VH	(4) VL	) VH	G	Pro-YTE	6
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	
	NO:4)	ID	NO: 85)	NO:3)	ID	NO: 74)	
		NO:84)			NO:		
					70)		

Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	E(C-	Fc-	27/2
AB	) VL	(4) VH	(4) VL	) VH	1)	IgG1KO-	8
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	YTE (SEQ	
	NO:4)	ID	NO: 85)	NO:3)	ID	ID	
		NO:84)			NO:82	NO:129)	
					), K-		
					coil(		
					C-1)		
					(SEQ		
					ID		
					NO:83		
					)		
Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	LGGGS	IgG1KO-	29/3
K	) VL	(5) VH	(5) VL	) VH	G	YTE (SEQ	0
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	ID	
	NO:4)	ID	NO:87)	NO:3)	ID	NO:128)	
		NO:86)			NO:		
					70)		

Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	E(C-	Fc-	31/3
AC	) VL	(5) VH	(5) VL	) VH	1)	IgG1KO-	2
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	YTE (SEQ	
	NO:4)	ID	NO:87)	NO:3)	ID	ID	
		NO:86)			NO:82	NO:129)	
					), K-		
					coil(		
					C-1)		
					(SEQ		
					ID		
					NO:83		
					)		
Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	LGGGS	IgG4-	33/3
M	) VL	(5) VH	(5) VL	) VH	G	Pro-YTE	4
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	
	NO:4)	ID	NO:87)	NO:3)	ID	NO: 74)	
		NO:86)			NO:		
					70)		

Compues to AD	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (5) VH (SEQ ID NO:86)	BAFF (5) VL (SEQ ID NO:87)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C- 1) (SEQ ID NO:82) , K- coil(C-1) (SEQ ID NO:83)	Fc- IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	35/3 6
Compues to C	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (6) VH (SEQ ID NO:88)	BAFF (6) VL (SEQ ID NO:89)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGS G (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:128)	37/3 8

5

10

15

20

Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	E(C-	Fc-	39/40
AE	) VL	(6) VH	(6) VL	) VH	1)	IgG1KO-	
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	YTE (SEQ	
	NO:4)	ID	NO:89)	NO:3)	ID	ID	
		NO:88)			NO:82	NO:129)	
					), K-		
					coil(		
					C-1)		
					(SEQ		
					ID		
					NO:83		
					)		
Compuesto	IL23A(1	BAFF	BAFF	IL23A(1	LGGGS	IgG4-	41/42
D	) VL	(6) VH	(6) VL	) VH	G	Pro-YTE	
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	
	NO:4)	ID	NO:89)	NO:3)	ID	NO: 74)	
		NO:88)			NO:		
					70)		

Compues to AF	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (6) VH (SEQ ID NO:88)	BAFF (6) VL (SEQ ID NO:89)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C- 1) (SEQ ID NO:82) , K- coil(C-1) (SEQ ID NO:83)	Fc- IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	43/4 4
Compues to A	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (7) VH (SEQ ID NO:90)	BAFF (7) VL (SEQ ID NO:91)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGS G (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:128)	45/4 6

Compues to AG	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (7) VH (SEQ ID NO:90)	BAFF (7) VL (SEQ ID NO:91)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C- 1) (SEQ ID NO:82) , K- coil(C-1) (SEQ ID NO:83)	Fc- IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:129)	47/48
Compues to B	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (7) VH (SEQ ID NO:90)	BAFF (7) VL (SEQ ID NO:91)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGS G (SEQ ID NO: 70)	IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:74)	49/50

5

10

15

20

Compues to AH	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (7) VH (SEQ ID NO:90)	BAFF (7) VL (SEQ ID NO:91)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C- 1) (SEQ ID NO:82) , K- coil(C-1) (SEQ ID NO:83)	Fc- IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	51/52
Compues to H	BAFF(4) VL (SEQ ID NO:85)	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (4) VH (SEQ ID NO:84)	LGGGS G (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:128)	53/54

5

Compuesto	BAFF	IL23A (	IL23A (1	BAFF	LGGGS	IgG4-	55/5
J	(4) VL	1) VH	) VL	(4) VH	G	Pro-YTE	6
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	
	NO: 85)	ID	NO:4)	NO:84)	ID	NO:74)	
		NO:3)			NO:		
					70)		
Compuesto	BAFF	IL23A (	IL23A (1	BAFF	LGGGS	IgG1KO-	57/5
L	(5) VL	1) VH	) VL	(5) VH	G	YTE (SEQ	8
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	ID	
	NO:87)	ID	NO:4)	NO:86)	ID	NO:128)	
		NO:3)			NO:		
					70)		
Compuesto	BAFF	IL23A (	IL23A (1	BAFF	LGGGS	IgG4-	59/6
N	(5) VL	1) VH	) VL	(5) VH	G	Pro-YTE	0
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	
	NO:87)	ID	NO:4)	NO:86)	ID	NO:74)	
		NO:3)			NO:		
					70)		
Compuesto	BAFF	IL23A (	IL23A (1	BAFF	LGGGS	IgG1KO-	61/6
O	(6) VL	1) VH	) VL	(6) VH	G	YTE (SEQ	2
	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ ID	(SEQ ID	(SEQ	ID	
	NO:89)	ID	NO:4)	NO:88)	ID	NO:128)	
		NO:3)			NO:		
					70)		

10

15

20

5	Compuest o P	BAFF (6) VL (SEQ ID NO:89)	IL23A (1) VH (SEQ ID NO:3)	IL23A (1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (6) VH (SEQ ID NO:88)	LGGGS G (SEQ ID NO: 70)	IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:74)	63/64
10	Compuest o Q	BAFF (7) VL (SEQ ID NO:91)	IL23A (1) VH (SEQ ID NO:3)	IL23A (1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (7) VH (SEQ ID NO:90)	LGGGS G (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:128)	65/66
15	Compuest o R	BAFF (7) VL (SEQ ID NO:91)	IL23A (1) VH (SEQ ID NO:3)	IL23A (1) VL (SEQ ID NO:4)	BAFF (7) VH (SEQ ID NO:90)	LGGGS G (SEQ ID NO: 70)	IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:74)	67/68

VL = cadena ligera de dominio variable, VH = cadena pesada de dominio variable, cada cadena comprende el enlazador GGGSGGG (SEQ ID NO:69) entre la VL y el VH.

También se utilizaron anticuerpos de control con fines de comparación. Los controles fueron anticuerpos monoclonales que se dirigían a BAFF o IL23.

Tabla 2B. Anticuerpos/antagonistas de control

Compuestos de control	Secuencia	
Anticuerpo de control 1 (anticuerpo monoclonal anti-BAFF) (BAFF (1))	BAFF(1) VH (SEQ ID NO:1)	BAFF(1) VL (SEQ ID NO:2)
Antagonista de proteína de fusión de control 2 (antagonista selectivo de BAFF que no es un anticuerpo) (BAFF (2))	BAFF(2) (SEQ ID NO:131)	
Anticuerpo de control 3 (anticuerpo monoclonal anti-BAFF) (BAFF (3))	BAFF(3) VH (SEQ ID NO:132)	BAFF(3) VL (SEQ ID NO:133)
Anticuerpo de control 4 (anticuerpo monoclonal anti-IL-23A) (IL-23A (1))	IL23A(1) VH (SEQ ID NO:3)	IL23A(1) VL (SEQ ID NO:4)

Ejemplo 2: Estabilidad térmica de los compuestos*Métodos*

Se monitoreó el despliegue térmico y la agregación de soluciones de los compuestos de 2 mg/ml en amortiguador de fosfato de 20 °C a 110 °C a una velocidad de barrido de 60 °C/h
5 mediante DSC capilar automático (MicroCal, LLC, Boston). Se llevaron a cabo dos barridos con el amortiguador correspondiente para establecer el historial térmico del instrumento y obtener el punto de referencia del instrumento para cada muestra, con el promedio de estos barridos sustraído
10 del termograma de proteína posterior para obtener la capacidad térmica aparente. Luego, se analizaron los barridos normalizados con Origin 7.0. Los puntos de referencia previos a la transición se sustrajeron de cada termograma de capacidad térmica resultante para proporcionar la capacidad térmica
15 excedente resultante ($C_{p,ex}$) en función de la temperatura. Los valores indicados de las temperaturas de transición (T_m) representan las posiciones de los picos máximos determinados mediante inspección visual de los termogramas experimentales.

20 *Resultados*

Los resultados se muestran en la Tabla 3. Los datos muestran que los compuestos de ejemplo que se dirigen a IL23A y BAFF tienen un intervalo de temperaturas de transición para el

primer pico (T_{m1}), que varía de 51.59 a 71.25°C. Los resultados son sorprendentes porque todos los compuestos de ejemplo tuvieron la misma estructura general y contuvieron las mismas secuencias de gen de VH y VL que se dirigen a IL-23A. Los compuestos con temperaturas de transición superiores son más estables y se previó que tengan una vida útil más larga.

Tabla 3. Temperaturas de transición de despliegue térmico para los compuestos

ID del Compuesto	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
Compuesto A	69.35	83.63
Compuesto B	65.87	--
Compuesto C	67.89	82.36
Compuesto D	64.93	--
Compuesto E	51.59	68.8
Compuesto F	52.75	64.48
Compuesto G	70.88	83.21
Compuesto H	71.25	83.62
Compuesto I	67.83	--
Compuesto J	68.26	--
Compuesto K	68.33	83.23

Compuesto L	68.3	82.58
Compuesto M	64.98	--
Compuesto N	65.52	--
Compuesto O	67.78	82.85

5

10 Ejemplo 3. Afinidad mediante resonancia de plasmones
superficiales (SPR) de los ejemplos ilustrativos

Se analizaron los compuestos de prueba mediante SPR para determinar la afinidad para BAFF e IL23A.

15

Materiales y métodos:

Los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un instrumento ProteOn XPR36 (Bio Rad). Se acondicionó previamente un chip de
20 GLM con inyecciones secuenciales de 60 s de SDS al 0.5 %, NaOH 50 mM y HCl 100 mM una velocidad de flujo de 30 µl/min en dirección vertical y horizontal.

Luego, se activó el chip de GLM acondicionado previamente

mediante una inyección de una mezcla de EDC (76.7 mg/ml) y sulfo-NHS (21.7 mg/ml) en una relación de 1:1 en 6 canales horizontales. Se inmovilizó el Fc de IgG de cabra anti-humano (GAHA) gamma (Invitrogen) a una concentración de 30 µg/ml en
5 amortiguador de acetato de sodio 10 mM, pH 5.0 a 8000 unidades de resonancia en el chip GLM activado en 6 canales horizontales. Finalmente, se desactivó el chip con HCl de etanolamina 1 M en 6 canales horizontales. El chip de GAHA preparado se rotó a una dirección vertical para capturar los
10 compuestos de prueba, con respecto a 5 canales verticales y el último canal se utilizó como una columna de referencia.

Luego, el chip capturado se rotó nuevamente hacia la dirección horizontal para su unión. Se inyectaron IL-23 humanas unidas
15 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc) con cinco concentraciones, 10.0 nM, 5.00 nM, 2.50 nM, 1.25 nM y 0.625 nM, de manera horizontal con respecto a las superficies de los compuestos de prueba durante 10 minutos a una velocidad de flujo de 40 µl/min en el siguiente amortiguador de ejecución
20 (Bio Rad): solución salina amortiguada con fosfato (pH 7.4), Tween 20 al 0.005 %. Se permitió la disociación durante 2 horas. La superficie de GAHA se regeneró mediante el uso de inyección de pulso corto (18 segundos) de ácido fosfórico al 0.85 % (Bio Rad) a una velocidad de flujo de 100 µl/min tanto

en dirección horizontal como vertical después de una asociación de 10 min y una disociación de 2 h. La GAHA regenerada estaba lista para otro ciclo de unión. La unión de compuestos de IL23 cynomolgus, BAFF humano o BAFF de cynomolgus se llevó a cabo en una forma similar, pero las concentraciones de titulación para la unión al BAFF humano o BAFF de cynomolgus son 6.25 nM, 3.12 nM, 1.56 nM, 0.78 nM y 0.39 nM.

Resultados:

10

Los resultados en la Tabla 4 muestran que ambos compuestos evaluados fueron capaces de unirse a BAFF e IL23 con una constante de disociación (KD) en el intervalo picomolar.

15 Tabla 4. Afinidad de unión de los compuestos a BAFF e IL23

20

ID del Compuesto	KD para BAFF humana (pM)	KD para BAFF de cynomolgus (pM)	KD para IL23 humana (pM)	KD para IL23 de cynomolgus (pM)
Compuesto	< 15	< 15	< 15	< 15

5

10

15

Ejemplo 4. Inhibición de activación de NFkB inducida por un trímero de BAFF de cynomolgus y humano en células informantes de luciferasa BAFFR-CHO

20 *Materiales/métodos:*

En resumen, las células informantes de luciferasa nFkB BAFFR CHO humanas se recolectan, se lavan, se cuentan y se resuspenden en una concentración de 1.6×10^6 células por ml

en un medio de ensayo (AM) de penicilina/estreptomicina al 1 % (v/v) en X-VIVO15, un medio libre de suero definido químicamente (Lonza). El trímero de BAFF humano o de cynomolgus recombinante (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) se preparó en una concentración única (52 pM) en AM y se preincubaron con AM solo o con titulaciones seriales del compuesto de prueba durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada. Luego de la preincubación de BAFF + compuesto de prueba, se agregaron 50 ul de la o las mezclas a 50 ul de las células y la placa de prueba se incubó adicionalmente a 37 °C (como se describe) durante 24 horas. Las muestras de control recibieron AM (controles sin estimulación) o un trímero de BAFF recombinante diluido en AM (controles con estimulación). Luego de 24 horas de incubación, la suspensión celular se trató con el reactivo STEADY-Glo 100 ul (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se sometió a ensayo para la expresión de luciferasa. Las unidades de luminiscencia relativas (RLU) resultantes se graficaron contra la concentración nanomolar Log₁₀ del compuesto de prueba, donde los valores IC₅₀ e IC₉₀ se calcularon mediante el uso de un modelo logístico de 4 parámetros, soportado por el complemento Xlfit de Excel (ID Business Solutions Limited). Los valores de IC₅₀ e IC₉₀ del compuesto de prueba se calcularon como se describen anteriormente y Geomeans se calcularon a

través de múltiples experimentos y se muestran en la Tabla 5 y Tabla 6.

Resultados:

5

Los compuestos de prueba inhibieron, de forma dependiente de la dosis, la activación de NFkB inducida por el trímero de BAFF humano y de cynomolgus en células informantes de luciferasa BAFFR-CHO. Los resultados ilustrados en la Tabla 5 y 6 indican
10 que los valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para los compuestos de prueba fueron comparables o más potentes que los antagonistas de BAFF de control.

Tabla 5: Valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para la
15 inhibición del trímero de BAFF humano en células informantes BAFFR-CHO

20

ID del Compuesto	IC50 (pM)	IC90 (pM)
Compuesto A	43	180
Compuesto B	39	256
Compuesto C	35	110
Compuesto D	34	172
Compuesto F	72	293
Compuesto O	27	119

5

10

15

Compuesto R	30	139
Compuesto X	106	361
Anticuerpo de control 1 (BAFF (1))	232	743
Antagonista de proteína de fusión de control 2 (BAFF (2))	173	914
Anticuerpo de control 3 (BAFF (3))	70	417

Tabla 6: Valores de la media geométrica IC_{50} e IC_{90} para la inhibición del trímero de BAFF de cynomolgus en células informantes BAFFR-CHO

20

ID del Compuesto	PM de la media geométrica IC_{50}	PM de la media geométrica IC_{90}
Compuesto A	132	191
Compuesto B	132	295
Compuesto D	118	248
Anticuerpo de control 1 (BAFF (1))	288	635

5	Antagonista de proteína de fusión de control 2 (BAFF (2))	602	1089
	Anticuerpo de control 3 (BAFF (3))	257	588

10

Ejemplo 5. Inhibición de activación de NFkB inducida por un trímero de BAFF humano en células informantes de luciferasa TACI-CHO

15 *Materiales/métodos:*

En resumen, las células informantes de luciferasa nFkB TACI CHO humanas se recolectan, se lavan, se cuentan y se resuspenden en una concentración de 1.6×10^6 células por ml en un medio de ensayo (AM) de penicilina/estreptomicina al 1 % (v/v) en X-VIVO15, un medio libre de suero definido químicamente (Lonza). El trímero de BAFF humano recombinante (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) se preparó en una concentración única (222 pM) en AM y se preincubaron con AM

solo o con titulaciones seriales del compuesto de prueba durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada. Luego de la preincubación de BAFF + compuesto de prueba, se agregaron 50 ul de la o las mezclas a 50 ul de las células y la placa de prueba se incubó adicionalmente a 37 °C (como se describe) durante 24 horas. Las muestras de control recibieron AM (controles sin estimulación) o un trómero de BAFF humano recombinante diluido en AM (controles con estimulación). Luego de 24 horas de incubación, la suspensión celular se trató con el reactivo STEADY-Glo 100 ul (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se sometió a ensayo para la expresión de luciferasa. Las unidades de luminiscencia relativas (RLU) se graficaron contra la concentración nanomolar Log₁₀ del compuesto de prueba, donde los valores IC₅₀ e IC₉₀ se calcularon mediante el uso de un modelo logístico parámetro 4, soportado por el complemento Xlfit de Excel (ID Business Solutions Limited). Los valores de IC₅₀ e IC₉₀ del compuesto de prueba se calcularon como se describen anteriormente y Geomeans se calcularon a través de múltiples experimentos y se muestran en la Tabla 7.

Resultados:

Los compuestos de prueba inhibieron, de forma dependiente de

la dosis, la activación de NFκB inducida por el trímero de BAFF humano en células informantes de luciferasa TACI-CHO. Los resultados ilustrados en la Tabla 7 indican que los valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para el compuesto de prueba fueron comparables a o más potentes que los antagonistas de BAFF de control.

Tabla 7: Valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para la inhibición del trímero de BAFF humano en células informantes TACI-CHO

ID del Compuesto	pM de la media geométrica IC ₅₀	pM de la media geométrica IC ₉₀
Compuesto A	159	417
Compuesto B	159	510
Compuesto D	163	436

5

10

Ejemplo 6. Inhibición de activación de NFkB inducida por un
60mer de BAFF en células informantes de luciferasa BAFFR-CHO

Materiales/métodos:

15

En resumen, las células informantes de luciferasa nFkB BAFFR
CHO humanas se recolectan, se lavan, se cuentan y se
resuspenden en una concentración de 1.6×10^6 células por ml
en un medio de ensayo (AM) de penicilina/estreptomicina al 1 %
20 (v/v) en X-VIVO15, un medio libre de suero definido
químicamente (Lonza). El 60mer de BAFF humano recombinante
(Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) se preparó en una
concentración única (4.2 pM) en AM y se preincubaron con AM
solo o con titulaciones seriales del compuesto de prueba

durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada. Luego de la preincubación de BAFF + compuesto de prueba, se agregaron 50 ul de la o las mezclas a 50 ul de las células y la placa de prueba se incubó adicionalmente a 37 °C (como se describe) durante 24 horas. Las muestras de control recibieron AM (controles sin estimulación) o un 60mer de BAFF humano recombinante diluido en AM (controles con estimulación). Luego de 24 horas de incubación, la suspensión celular se trató con el reactivo STEADY-Glo 100 ul (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se sometió a ensayo para la expresión de luciferasa. Las unidades de luminiscencia relativas (RLU) se graficaron contra la concentración nanomolar Log₁₀ del compuesto de prueba, donde los valores IC₅₀ e IC₉₀ se calcularon mediante el uso de un modelo logístico parámetro 4, soportado por el complemento Xlfit de Excel (ID Business Solutions Limited). Los valores de IC₅₀ e IC₉₀ del compuesto de prueba se calcularon como se describen anteriormente y Geomeans se calcularon a través de múltiples experimentos y se muestran en la Tabla 8.

20

Resultados:

Los compuestos de prueba inhibieron, de forma dependiente de la dosis, la activación de NFκB inducida por el 60mer de BAFF

humano en células informantes de luciferasa BAFFR-CHO. Los resultados ilustrados en la Tabla 8 indican que los valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para los compuestos de prueba A, B, C, D, O, P, Q y R fueron más potentes que los tres antagonistas de BAFF de control.

Tabla 8: Valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para la inhibición del 60mer de BAFF humano en células informantes BAFFR-CHO

ID del Compuesto	IC ₅₀ (pM)	IC ₉₀ (pM)
Compuesto A	6	19
Compuesto B	6	17
Compuesto C	6	14

5

10

15

20 Ejemplo 7: Neutralización de la activación de NFkB inducida
por BAFF unido a la membrana en células informantes de
luciferasa BAFFR-CHO

Materiales/métodos:

Las células CHO-K1 que expresan BAFF humano se contaron y resuspendieron a una concentración de 2×10^6 células por ml en medio de crecimiento estándar. Para detener la escisión del
5 BAFF unido a la membrana, las células se trataron con paraformaldehído al 0.125 % (Electron Microscopy) y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Las células BAFF CHO-K1 humanas fijas se lavaron y resuspendieron luego a 2×10^6 células por ml en medio de crecimiento estándar y se
10 incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células BAFF CHO-K1 humanas fijas se recolectaron y resuspendieron luego a una concentración 3.2×10^6 células por ml en X-VIVO15, un medio de ensayo libres de suero definido químicamente (Lonza) (AM) que contienen pencilina/estreptomicina al 1 %
15 (v/v).

Las células informantes de luciferasa nFkB BAFFR CHO humanas se recolectan, se lavan, y se resuspenden en una concentración de 1.6×10^6 células por ml en un medio de ensayo. Las células
20 BAFF CHO-K1 humanas fijas preparadas a 3.2×10^6 células por ml en AM y preincubadas con titulaciones seriales de los compuestos de prueba durante 30 minutos se agregaron luego a 50 ul de células informantes de luciferasa NFkb BAFFR CHO humanas e incubadas adicionalmente a 37 °C durante 24 horas.

Las células informantes de control recibieron AM solo (controles sin estimulación) o las células BAFF CHO-K1 humanas fijas se diluyeron en AM (controles con estimulación). Luego de 24 horas de incubación, las muestras se trataron con el reactivo STEADY-Glo 100 μ l (Promega), y se sometió a ensayo para determinar la expresión de luciferasa. Las unidades de luminiscencia relativas (RLU) se graficaron contra la concentración nanomolar Log_{10} del compuesto de prueba, donde los valores IC_{50} e IC_{90} se calcularon mediante el uso de un modelo logístico de 4 parámetros, soportado por el complemento Xlfit de Excel (ID Business Solutions Limited). Los valores de IC_{50} e IC_{90} de los compuestos de prueba se calcularon como se describen anteriormente y Geomeans se calcularon a través de múltiples experimentos y se muestran en la Tabla 9.

15

Resultados

Los compuestos de prueba inhibieron, de forma dependiente de la dosis, la activación de NF κ B inducida por BAFF humano unido a las membranas en células informantes de luciferasa BAFFR-CHO. Los resultados ilustrados en la Tabla 9 indican que los valores IC_{50} e IC_{90} para los compuestos de prueba fueron más potentes que los tres antagonistas de BAFF de control.

20

Tabla 9: Valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para la inhibición de mbBAFF en células informantes BAFFR-CHO

ID del Compuesto	IC ₅₀	IC ₉₀
	(pM)	(pM)
Compuesto A	118	1015
Compuesto B	125	1139
Compuesto D	104	938
Anticuerpo de control 1 (BAFF (1))	553	10116
Antagonista de proteína de fusión de control 2 (BAFF (2))	581	3678
Anticuerpo de control 3 (BAFF (3))	250	2916

Ejemplo 8: Inhibición de la actividad de IL-23 humana en linfocitos B de linfoblastos (células DB) con células informantes de luciferasa de STAT3

Materiales/métodos:

Los linfocitos B de linfoblastos (células DB; n.º de catálogo de ATCC CRL-2289) se transdujeron de forma estable con un STAT-3 lentiviral/gen informante de luciferasa (Qiagen). Las células transducidas se mantuvieron bajo selección mediante el uso de puromicina (Life Technologies). El medio de cultivo completo fue medio RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % (Hyclone) y puromicina 2 µg/mL (Life Technologies). El medio de ensayo fue un medio RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % (Hyclone).

10

Las células DB-STAT3 modificadas se cultivaron a 20 000 células/pocillo en una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano a 80 µL/pocillo en un medio de ensayo. Los compuestos de prueba (10x) se prepararon en placas de 96 pocillos de fondo redondo de polipropileno en un medio de ensayo y se diluyeron de forma acorde para crear intervalos de dosis de 1 µg/mL a 10 pg/mL. 10 µL de moléculas de prueba o medio de ensayo diluido (para pocillos de control) se agregaron a cada pocillo en tres veces. 10 µL of 10x de IL-23 humana (a una concentración final de 75 ng/mL por placa) se agregaron a cada pocillo. Alternativamente, se agregaron 10 µL de medio a los pocillos de control. La dosis de IL-23 seleccionada para el uso en el ensayo representa la dosis estimulante EC₆₀ de IL-23 humana para células DB modificadas como se determina en los estudios

20

anteriores. Se incubaron las placas durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. El reactivo de ensayo de luciferasa ONE-Glo™ (Promega) se preparó y se agregaron 100 µL a cada pocillo y se mezclaron. La luminiscencia se midió en un lector de placas Envision y luego se graficó (eje y) contra la concentración del anticuerpo (eje x). Los valores IC₅₀ de los compuestos se determinaron mediante la aplicación de los datos a una función dosis-respuesta sigmoide de 4 parámetros mediante el uso del software GraphPad Prism 6. Los valores IC₉₀ se determinaron mediante el cálculo de los datos con Find ECanything con el software GraphPad Prism 6. Las medias geométricas se calcularon a través de los múltiples experimentos y se muestran en la Tabla 10.

15 *Resultados*

Los resultados mostraron que los compuestos evaluados fueron capaces de inhibir la actividad de IL-23 humana en células DB con informantes de luciferasa de STAT3.

20

Tabla 10. Valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para la inhibición de la IL-23 humana en linfocitos B de linfoblastos.

ID del Compuesto	IC ₅₀ (pM)	IC ₉₀ (pM)
Compuesto A	145	1229

5

Ejemplo 9: Inhibición de la actividad de IL-23 humana y de
10 cynomolgus en esplenocitos de ratón

Materiales y métodos

Se aislaron células mononucleares de bazos de ratón (hembra
15 C57BL/6 de menos de 13 semanas de edad; JAX, Jackson
Laboratories), se lavaron, se contaron y se resuspendieron a
4X10⁶ células/ml en un medio de linfocitos T estándar (TCM).
Se agregaron cien microlitros de la suspensión de mIL-
2/esplenocitos a placas de microtitulación de 96 pocillos. Se
20 diluyó la IL-23 humana recombinante (Boehringer Ingelheim
Pharmaceuticals, Inc.) o IL-23 de cynomolgus recombinante
(Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) en TCM y se
preincubó durante 2 horas a 37 °C con TCM solo o con
titulaciones de muestras de prueba. Después de la preincubación

de la muestra de prueba + IL-23, se agregaron 100 μ l de la o las mezclas a las células y se incubaron las placas de prueba a 37 °C con aire humedecido con CO₂ al 5 % durante 48 h. Las muestras de control recibieron TCM (controles sin estimulación) o IL-23 recombinante diluida en TCM (controles con estimulación). Después de la incubación, se determinaron los niveles de IL-17 a partir del sobrenadante mediante el uso de un inmunoensayo de IL-17 de ratón Quantikine® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems). Se determinaron los valores pg/ml de mIL-17 interpolada para cada muestra y se convirtieron en porcentaje de control (POC). El POC se graficó en función de la concentración de la muestra de prueba y se calcularon los valores de IC₉₀ mediante el uso de un modelo de logística de 4 parámetros habilitado por el complemento XLfit de Excel (software Activity Base, ID Business Solutions, Ltd.). Se analizaron los compuestos de prueba con respecto a IC₅₀ e IC₉₀ tal como se describió anteriormente, y se calcularon las medias geométricas a través de múltiples experimentos para cada compuesto de prueba y se muestran en la Tabla 11.

20

Resultados

Los resultados muestran que los compuestos evaluados fueron capaces de inhibir la liberación de IL-17 en esplenocitos de

ratón inducida con IL23 de cynomolgus y humana.

Tabla 11: Valores de la media geométrica IC₅₀ e IC₉₀ para inhibir la IL-23 humana y de cynomolgus en esplenocitos de ratón

5

10

15

ID del Compuesto	IL23 humana		IL23 de cyno	
	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
	(pM)	(pM)	(pM)	(pM)
Compuesto A	146	1647	155	1309
Compuesto B	202	1360	200	1480
Compuesto C	133	761	110	880
Compuesto D	105	1700	97	1554
Anticuerpo de control 4 (IL-23A (1))	84	366	64	331

Materiales y métodos:

Se llevaron a cabo estudios de PK de dosis intravenosa (IV) única para los Compuestos de prueba A, B, C y D en monos cynomolgus macho (n = 2 por molécula). Las dosis se administraron como una inyección de bolo IV lenta de 1 mg/kg. Se recolectaron muestras de sangre entera antes de la dosis y 0.25, 2 y 6 h luego de la dosis en el día de la dosificación y

1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21 y 28 días luego de la dosis. Las concentraciones en suero de moléculas dosificadas se midieron mediante un ensayo de unión al ligando basado en MSD.

5 Se prepararon muestras de la curva estándar de calibración y control de calidad (QC) en suero agrupado de monos cynomolgus al 100 %. Cada curva estándar consistió en siete puntos distintos a cero que comenzaron en 512 ng/mL y luego se diluyeron en serie tres veces. También se incluyó una muestra
10 vacía (matriz sin analito). Se prepararon cinco muestras de QC en intervalos bajo, medio y alto que comenzaron en 256 ng/ml, luego se diluyeron en serie cuatro veces hasta 8 ng/mL, luego se utilizó una dilución de 2 veces para preparar el QC más bajo a 4 ng/mL. Las muestras de curva estándar y QC se incluyeron
15 en duplicado durante cada ejecución analítica. Se definieron los límites de cuantificación inferior y superior como los puntos de QC más bajo y más alto capaces de tener concentraciones reproducibles retrocalculadas que no exceden el 30 por ciento (%) de las concentraciones nominales. El
20 criterio de aceptación para los puntos de la curva estándar fue de 30 por ciento (%) de las concentraciones nominales.

Para medir la concentración de fármaco activo en muestras de suero, se preparó una mezcla maestra, que combina la detección

de BAFF humano recombinante biotinilado 0.5 $\mu\text{g/mL}$ e IgG antihumana de cabra sulfoetiquetada 0.5 $\mu\text{g/mL}$ en el amortiguador de unión (BSA al 5 % en 1x PBS con Tween 20 al 0.05 %). La mezcla maestra se agregó a una placa sin unión y
5 que bloquea de luz de 96 pocillos a 50 μL por pocillo. Se agregaron veinticinco μL de estándares y QC (solución madre diluida 1:20 en amortiguador de unión) por pocillo en duplicado a la placa sin unión que contiene la mezcla maestra. Las muestras de suero desconocidas se diluyeron 1:20 en el
10 amortiguador de unión y 1:400 en el amortiguador de unión que contiene suero al 5 %. Veinticinco μL de muestras diluidas se agregaron por pocillo a placas sin unión que contienen la mezcla maestra. Las placas sin unión se incubaron a temperatura ambiente en un agitador de placas (500 rpm, 1.5 h). En paralelo,
15 se bloqueó una placa de oro de estreptavidina mediante el uso de amortiguado de bloqueo 150 μL (BSA al 5 % con 1X PBS con Tween 20 al 0.05 %) y se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas (500 rpm, 1.5 h). Luego de la incubación, las placas de MDS se lavaron tres veces con 300 μL por pocillo
20 de amortiguador de lavado (Tween 20 al 0.05 % en 1XPBS). Cincuenta μL de la muestra de las placas sin unión se agregaron a las placas de MDS y se incubaron a temperatura ambiente (1.5 h, 600 rpm). Luego de la incubación, las placas se lavaron tres veces con amortiguador de lavado y se agregaron 150 μL de 2x

amortiguador T de lectura a cada pocillo y se llevó a cabo la lectura inmediatamente en un MSD Sector Imager 2400. Las curvas estándar se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros mediante el uso del software MSD Sector Imager. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante el uso del análisis no compartimental en Phoenix WinNonlin 6.3 (Certara, MD, EUA).

Resultados:

La concentración en suero media (SD) con respecto a los perfiles temporales para los compuestos de prueba se ilustran en la Figura 2. Los parámetros farmacocinéticos promedio (SD) para los compuestos de prueba se resumen en la Tabla 12. Las muestras de suero que muestran una disminución abrupta en la concentración de fármaco en el tiempo, que se confirmó que fueron positivas para el anticuerpo antifármaco se excluyeron de los cálculos de parámetros farmacocinéticos.

Tabla 12: Los parámetros farmacocinéticos medios (SD) de los compuestos de prueba en monos cynomolgus machos luego de una dosis intravenosa única de 1 mg/kg.

ID del Compuesto	AUC _{0-última} (µg*d/mL)	AUC _{0-inf} (µg*d/mL)	CL (mL/día/kg)	Vss (mL/kg)	T _½ (días)
Compuesto	52.5	54.2 (7.1)	18.6 (2.4)	61.6	3.1

5

10

Ejemplo 11. Predicción de la PK en humanos y la dosis en humanos
15 de un compuesto de ejemplo

Se utilizó un ajuste de Dedrick elemental para ajustar las concentraciones de suero de mono medias del Compuesto B a la humana, mediante un exponente alométrico de 1.0 para el volumen
20 de distribución y 0.85 para depuración. El perfil de concentración-tiempo de suero i.v. humano predicho se ajustó a un modelo de dos compartimentos lineales. El perfil de concentración-tiempo de suero s.c. humano se predijo mediante la combinación de parámetros a partir del modelo i.v. de dos

compartimentos con la velocidad de absorción s.c. media y biodisponibilidad observada para los mAb terapéuticos comercializados. Se predice que la depuración y semivida terminal es de 0.34 L/d y 9.9 d en humanos saludables, respectivamente. El perfil de concentración-tiempo de suero humano previsto del Compuesto B, luego de una dosis s.c. de 100 mg administrada una vez cada dos semanas se muestra en la Figura 3

La dosis eficaz humana prevista es 1 mg/kg administrada s.c. una vez cada dos semanas. Este régimen de dosis se prevé para mantener una $C_{min} \geq 30$ nM (6 μ g/mL) con una administración s.c. bisemanal o menos frecuente. La dosis eficaz prevista puede basarse en las respuestas a la concentración-biomarcador Pd observadas para belimumab (Benlysta®), tabalumab y blisibimod en pacientes con SLE y RA. En estos estudios, la inhibición máxima de biomarcadores asociados con BAFF se relaciona con una C_{min} en estado estable de 30-40 nM. La concentración necesaria para neutralizar IL23 es mucho más baja que la necesaria para neutralizar BAFF y, por lo tanto, no tiene un impacto en la C_{min} necesaria general para el antagonista dual.

Ejemplo 12. Purificación de compuestos

Métodos:

Los compuestos se purificaron mediante el uso de Mab Select SuRe como una etapa de purificación por afinidad.

5

La elución se llevó a cabo mediante el uso de un amortiguador de acetato de sodio, pH 3.5. A continuación de la purificación con Mab Select SuRe, la muestra se neutralizó y se aplicó a una resina Poros 50 HS y se eluyó mediante el uso de un gradiente de cloruro de sodio en un amortiguador de citrato de sodio. El pico de monómero se eluye a 20 mM de NaCitrato y NaCl 120 mM pH 6.0. A continuación de la cromatografía de intercambio de iones, la muestra fue constantemente monómero >95 %.

15

Se utilizó un experimento de velocidad de sedimentación (SV) mediante ultracentrifugación analítica (AUC) para proporcionar información sobre la pureza de la muestra y los estados de agregación. Las muestras fueron centrifugadas en XL-I óptima (Beckman Coulter, Fullerton, CA) a 20 °C mediante un rotor de cuatro orificios An60Ti con una ejecución a 40 000 rpm. El proceso de sedimentación se monitoreó mediante absorbancia ultravioleta a 280 nm, mediante el uso del amortiguador de dilución correspondiente como amortiguador de referencia. La

20

variación en la distribución de concentración en la célula de la ultracentrífuga con el transcurso del tiempo se recolectó mediante el uso del software operativo de XL-I y se analizó mediante el uso de un modelo de distribución continua $c(S)$ en el software SEDFIT (versión 14.1) para proporcionar el coeficiente de distribución de sedimentación. Se calculó el porcentaje de monómero en función del área de pico integrada.

Resultados:

10

Los resultados de la purificación de los compuestos se muestran en la tabla 13. Los datos muestran que los compuestos tienen una pureza y homogeneidad altas que indican una estabilidad satisfactoria.

15

Tabla 13

20

Nombre del parámetro	Compuestos A, B, C, D
Porcentaje de monómero (velocidad de sedimentación)	monómero al 99 % agregado al 1 %

Ejemplo 13: Perfil de espectrometría de masas de los compuestos

Métodos:

Muestra natural

Este procedimiento proporcionó la masa intacta del compuesto o la proteína. Se inyectaron 0.15 μ l de la muestra a una columna Agilent Poroshell 300SB-C3, 5 μ m, (30x1.0mm). La temperatura de la columna fue de 80 °C y la velocidad de flujo fue de 150 μ l/min. El compuesto o la proteína se eluyó de la columna con un gradiente de B al 10 % a los 0 minutos a B al 85 % a los 6 minutos. La fase móvil A fue de agua/acetonitrilo/ácido fórmico/acetato de amonio (99/1/0.1/2 mM) y la fase móvil B fue de n-propanol/acetonitrilo/agua/ácido fórmico (70/20/10/0.1). El efluente se dirigió hacia un espectrómetro de masas Agilent 6224 TOF, que se escaneó de la masa 600 a la masa 3200. Los datos sin procesar se deconvolucionaron con el programa MassHunter.

Muestra reducida

Este procedimiento proporcionó la masa de la proteína o la cadena ligera y la masa de la cadena pesada. 5 μ l de la muestra se agregaron a 5 μ L de una mezcla 20:1 de Guanadina 8 M HCL:TCEP y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. 0.15 μ l de esta muestra se inyectó como anteriormente con las

siguientes diferencias: el compuesto o la proteína se eluyó de la columna con un gradiente de B al 5 % a los 0 minutos a B al 85 % a los 6 minutos, la temperatura de la columna fue 60 °C y el intervalo de masa fue de 600-2000.

5 Muestra desglicosilada

Este procedimiento proporcionó la masa desglicosilada de la proteína o de la cadena ligera y de la cadena pesada. 7.5ul de la muestra se agregaron a 3.2 uL de una mezcla 20:1 de bicarbonato de amonio:PNGasa F 400 mM y se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Luego, 10 ul de la mezcla 20:1 de Guanadina HCL:TCEP 8 mM se agregaron a la muestra y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se inyectó tal como se describió anteriormente para la mezcla reducida.

15

Mapecto de péptido mediante espectrometría de masas

Se diluyeron muestras en un amortiguador de desnaturalización que consiste en GdHCl 6M, Tris-HCL 250 mM pH 7.5 y DTT 10 mM y luego se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se alquilaron luego con yodoacetamida y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las mezclas de reacción se purificaron y el amortiguador se intercambié a Tris-HCL 100mM pH 7.5 mediante el uso de

cartuchos Sephadex G-25 Superfine. Las muestras se digirieron luego con tripsina durante una incubación de 4 horas a 37 °C. Las mezclas de reacción digeridas se inactivaron posteriormente mediante la adición de TFA.

5

La digestión triptica obtenida se inyectó en una columna de fase inversa Phenomenex Jupiter C18 mediante el automuestreador de un Dionex Ultimate 3000 HPLC. Se utilizó un sistema de solvente de gradiente que consiste en solvente A: ácido fórmico al 0.1 %/agua al 99 %/acetonitrilo al 1 % y el solvente B: ácido fórmico al 0.1 %/agua al 5 %/acetonitrilo al 95 %. El porcentaje de solvente B se aumentó desde 0 % a 38 % durante 140 minutos. Se llevó a cabo la separación cromatográfica a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 100 µl/min. El almacenamiento de la muestra en el automuestreador fue a 4 °C. Luego de la separación cromatográfica la muestra ingresó a un espectrómetro de masas Thermo Scientific Orbitrap Fusion operado en un modo de ionización de electroaspersión positiva. El método empleado incluyó los tipos de activación de CID mediante el uso de una resolución de 30 000, una señal mínima de 10 000, un ancho de aislamiento de 1.0 y una energía de colisión normalizada de 35.0 V. El nivel de RF del lente S se estableció a 20 %. El tipo de recolección de datos es un perfil para el escaneo MS total y centroide para los datos CID MS/MS.

20

Los datos se recolectan en un intervalo de masa de 250-2000 Da a una velocidad de adquisición de 1 espectro/segundo.

Los datos de fragmentación LC-MS y LC-MS/MS sin procesar
5 recolectados de la digestión enzimática se analizaron mediante el uso de Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) contra la secuencia dada. Los péptidos identificados que contienen un consenso de N-X-S/T (X no es P) se analizaron luego mediante extracción manual de EIC para los péptidos glicosilados. Las
10 intensidades de MS de los péptidos glicosilados a través de EIC se utilizaron para estimar sus porcentajes de la abundancia total de glicoformas.

Resultados:

15

Los resultados se muestran en la Tabla 14. Los datos indican que se han expresado y recuperado la estructura y la secuencia de aminoácidos prevista sin heterogeneidad inesperada. El patrón de glicosilación es típico de un anticuerpo convencional
20 expresado en células CHO y no muestra ninguna estructura atípica.

Tabla 14:

5

10

15

Parámetro	Compuesto B
Espectrometría de masas: Perfil de peso molecular intacto	Secuencia intacta/coincidente
Espectrometría de masas: Perfil de glicosilación	Similar a IgG expresada en CHO

Ejemplo 14: El contenido de monómeros en una concentración alta

El fin de la descripción de este proceso es evaluar las propiedades inherentes del compuesto B mediante la evaluación de la agregación con un aumento de concentración. Se utiliza un amortiguador estándar de NaCitrato 20 mM, NaCl 120 mM pH 6 sin evaluación de formulación para entender la propensión de moléculas al agregado.

Métodos:

El compuesto B se concentró gradualmente hasta una concentración lo más alta posible sin precipitación observada
5 mediante el uso de un filtro de centrifugación Amicon Ultra con un peso molecular reducido de 50 000 Dalton (Millipore, Billerica). Las soluciones de proteína concentradas se sometieron luego a un análisis SEC analítico para proporcionar información sobre los estados de pureza y agregación de la
10 muestra. La cromatografía se llevó a cabo mediante el uso de HPLC Agilent Serie 1200. El sistema de ejecución a 1.0ml/min durante 23 minutos. ~30ug de material se inyectaron en una columna Tosoh Biosciences TSKgel G3000SWXL (5um 250a 7.8x30 cm) y los resultados se leyeron a 280 nm. Se utilizó el
15 amortiguador de migración fosfato sódico 50 mM, L-arginina 0.2 M pH 6.8.

Resultados:

20 El resumen de datos SEC analítico para el compuesto B durante el proceso de concentración se enumera en la Tabla 15 y la Figura 4 Se presentan los datos que muestran agregación y pureza de muestra a concentraciones en aumento lo que demuestra que el compuesto B no tiene una propensión a agregarse con un

aumento de concentración.

Tabla 15. Resumen de datos SEC analítico para el compuesto B durante el proceso de concentración

5

10

15

20

Concentración del compuesto B (mg/ml)	Datos SEC analítico
10	monómero al 99.6 %, agregado al 0.4 %
20	monómero al 99.5%, agregado al 0.5%
40	monómero al 99.6 %, agregado al 0.4 %
75	monómero al 99.5%, agregado al 0.5%
100	monómero al 99.5%, agregado al 0.5%
121	monómero al 99.5%, agregado al 0.5%

M = monómero, A = agregado

Ejemplo 15: Valencia de los compuestos

Métodos:

Se utilizó electroforesis analítica confinada a la membrana para medir la valencia de compuestos que fueron dializados previamente en un amortiguador de acetato 10 mM, KCl 50 mM pH 5.0 durante la noche. En la configuración experimental, se cargaron 20 μ L de muestra a 1 mg/mL en una cubeta de cuarzo de 2x2x4 mm³ cuyos dos extremos fueron sellados mediante 10 membranas de grado celulosa regenerada semipermeable MWCO. Estas membranas atrapan las macromoléculas mientras permiten que pasen el agua y los componentes de solvente. Se aplicó luego una corriente eléctrica de 1 mA a través de la cubeta, lo que estableció un campo eléctrico a lo largo de su longitud en el que la macromolécula cargada se mueve en el campo eléctrico con un flujo continuo de amortiguador fresco. Se detectó el límite de concentración móvil en tiempo real mediante el uso de una matriz de fotodiodos lineal (LPDA) que proporciona lecturas de intensidad espaciadas a lo largo de la cubeta. La velocidad del límite de concentración se utilizó para calcular la movilidad electroforética y posteriormente la valencia eficaz. Se utilizó posteriormente información adicional tal como el radio de Stokes (obtenido a partir de la velocidad de sedimentación ejecutada en el AUC), radio de

contraíón (0.122 nm para el ión de cloruro), conductancia de amortiguador (6.35 mS) y resistencia iónica (0.05 M) para revelar la valencia subyacente de la macromolécula.

5 *Resultados:*

Los datos de la valencia (ver Tabla 16) indican una estabilidad coloidal de los compuestos en solución, es decir, la interacción neta de la proteína y la proteína en solución. Los compuestos con una valencia mayor que 15 tienen una interacción repulsiva neta fuerte y un potencial alto para formularse a una concentración alta.

Tabla 16. Datos de valencia para los compuestos

15

ID del Compuesto	Valencia a pH 5.0
Compuesto A	24.4 $\pm$ 0.2
Compuesto B	21.5 $\pm$ 0.3
Compuesto D	21.8 $\pm$ 0.2

20 Ejemplo 16: Estabilidad en sangre entera de los compuestos.

Métodos

Se desarrolló un ensayo de interferencia en sangre entera en

un octeto RED96 para detectar los efectos de la unión no específica o la unión fuera de la objetivo para los compuestos en presencia de la sangre entera (WB). Se incubaron las soluciones de los compuestos en sangre entera y amortiguador de ejecución cinético 1x (1xkb) a una temperatura de 37 °C durante 48 horas. Se llevaron a cabo mediciones cinéticas para las muestras de compuestos incubadas con un octeto RED96 equipado con puntas de un biosensor de estreptavidina (SA) (ForteBio, Menlo Park, CA) a 27 °C. Se indicó la relación de las señales de velocidad de asociación/de unión en amortiguador y sangre entera. Se consideró que una relación < 2 no muestra interferencia.

Resultados

15

Los resultados se muestran en la Tabla 17. No se observó una interferencia en sangre entera para los compuestos de prueba.

Tabla 17. Resultados de unión en sangre entera para los compuestos

Parámetros	Relación de señales de unión en WB/amortiguador cinético con respecto a BAFF hu	Relación de señales de unión en WB/amortiguador cinético con respecto a IL23 hu
Compuesto A	1.2	1.1
Compuesto B	1.2	1.5

20

5

Compuesto D	1.3	1.7
Compuesto E	1.0	1.1
Compuesto F	1.0	1.2

Ejemplo 17: Predicción de inmunogenicidad in silico

10

Métodos

Se predijo la inmunogenicidad de terapéuticos de proteína in silico mediante el uso de una herramienta informática, EpiMatrix, que fue desarrollada por EpiVax, Inc. (Providence, RI).

EpiMatrix incorpora la predicción del epítipo que asiste a T, así como el T-epítipo, de los cuales el primero provoca una respuesta inmunitaria mientras que el último es inhibidor. En resumen, la secuencia de proteína se analizó, en primer lugar, en marcos de péptidos de 9 mer superpuestos que se había probado que eran el núcleo de la unión de HLA clase II. Se evaluó el potencial de unión de los péptidos de 9 mer con respecto a cada

uno de los ocho alelos de HLA clase II comunes en función de los datos experimentales o la predicción informática. Se genera una clasificación para reflejar el potencial de unión del péptido de 9 mer con respecto a cada alelo de HLA y se lleva a cabo la normalización para hacer posible la comparación de cualquiera de 9 mer a través de múltiples alelos de HLA y permitir la predicción de inmunogenicidad a escala global. Al final, el programa genera una "clasificación de inmunogenicidad" general, clasificación tReg Adjusted Epx, la probabilidad de que los compuestos provoquen una respuesta inmunitaria in vivo.

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 18. Los registros de inmunogenicidad general para los compuestos de prueba son bajos y se predice que estos compuestos posiblemente no producirán una respuesta inmunitaria fuerte in vivo.

Tabla 18 Puntajes EpiVax

Parámetro	EpiVax (Cadena 1, Cadena 2)
Compuesto A	-46.13, -28.39
Compuesto B	-45.77, -28.39
Compuesto C	-41.40, -28.42
Compuesto D	-41.01, -28.42
Compuesto E	-39.81, -41.43

5	Compuesto F	-42.15, -36.94
	Compuesto G	-43.75, -29.30
	Compuesto H	-35.19, -43.44
	Compuesto I	-43.38, -29.30
	Compuesto J	-34.78, -43.44
10	Compuesto K	-43.75, -33.61
	Compuesto L	-37.80, -43.44
	Compuesto M	-43.38, -33.61
	Compuesto N	-37.40, -43.44
	Compuesto O	-34.66, -39.56
15	Compuesto P	-34.24, -39.56
	Compuesto Q	-34.64, -47.37
	Compuesto R	-34.22, -47.37
	Compuesto S	-40.96, -40.09
	Compuesto T	-43.91, -40.09
20	Compuesto U	-41.31, -44.98
	Compuesto V	-42.53, -36.94
	Compuesto W	-38.33, -44.98
	Compuesto X	-39.42, -41.43

Ejemplo 18: Inhibición de BAFF humano en el ensayo de proliferación de linfocitos B humanos primarios

Materiales y métodos

Las muestras de sangre saludable normales (n = 3 donantes)
5 utilizados en este estudio se adquieren de Biological Specialty Corporation, Philadelphia, PA. El medio de cultivo completo fue IMDM (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % (Life Technologies) más Pen/Strep (Life Technologies). El amortiguador de aislamiento de linfocitos B consiste en Mg⁺⁺
10 and Ca⁺⁺ estéril libre de DPBS (Life Technologies) más FBS al 2 % más EDTA 2 mM (Life Technologies).

Aislamiento de linfocitos B humanos de sangre entera humana saludable

15 Se transfirieron cuatrocientos mL de sangre entera heparinizada a una botella de poliestireno estéril de 1000 mL y se agregó un volumen igual de DPBS. Treinta y cinco 35 mL de sangre diluida con PBS se colocó en la parte superior de un gradiente
20 Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare) 15 mL cargado previamente en un tubo de fondo redondo de poliestireno 50 mL. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos sin parar. Luego, dos tercios del sobrenadante superior se aspiró y la capa gris media que contiene células

mononucleares de sangre periférica (PBMC) se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL. Se agregó DPBS (libre de Ca^{++} y Mg^{++}) + FBS al 2 % FBS, hasta un volumen de 50 mL. Los tubos se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. El sedimento
5 celular resultante se resuspendió con DPBS (libre de Ca^{++} and Mg^{++}) + FBS al 2 % (amortiguador de lavado) y la etapa de centrifugado (1200 rpm durante 10 minutos) se repitió. El sedimento celular se resuspendió nuevamente en amortiguador de lavado hasta 50 mL. La viabilidad celular y concentración
10 celular se midió en este punto.

El tubo se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se descartó. El sedimento celular se resuspendió con un medio de cultivo completo y la concentración celular se
15 ajustó a 5×10^6 células/mL. Las células suspendidas se colocaron en un matraz de cultivo de tejidos de 75 cm^2 en una incubadora de CO_2 al 5 % (al 37 °C) durante la noche. Los linfocitos B se aislaron luego mediante el uso del kit de linfocitos T humanos Dynabeads® Untouched™ (Life Technologies)
20 siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración celular se ajustó para ser adecuada para el procedimiento corriente abajo luego de la medición de la concentración y viabilidad celular.

Evaluación de proliferación de linfocitos B mediante el uso de un ensayo de incorporación de ^3H -timidina

Los linfocitos B se cultivan en una placa de fondo redondo de 5 96 pocillos de cultivo de tejido Falcon (1×10^5 células/100 μL de medio de cultivo por pocillo). Luego, los artículos de prueba se prepararon a concentraciones seriales 4x que varían de 0.028 a 20 nM y estímulos de linfocitos B (anticuerpos anti-IgM y BAFF humano) en concentraciones 4x (8 $\mu\text{g/mL}$ y 20 ng/mL, 10 respectivamente) con un medio de cultivo completo. Se agregaron 50 μL de artículos de prueba prediluidos a los pocillos respectivos (0.007 a 5 nM, concentración final). Luego, se agregaron 50 μL de IgM antihumana de cabra prediluido (2 $\mu\text{g/mL}$, concentración final) y hBAFF (5 ng/mL o 98 pM, concentración 15 final) a los pocillos correspondientes (ver Figura 6). Se cultivaron linfocitos B en una incubadora humidificada con CO_2 al 5 % a 37 °C durante 72 horas. Dieciocho horas antes del extremo de la incubadora, se agregaron 20 μL de 1 μCi de ^3H -timidina (Pelkin Elmer) a cada pocillo. Se utilizó un 20 recolector de células para transferir ADN con ^3H -timidina incorporada/pocillo a una placa de filtro de vidrio de microfibra, donde se agregaron 30 μL de un potenciador de centelleo a los pocillos luego de secar al aire la placa durante al menos 4 horas. El valor de los conteos por minuto (cpm) de

cada pocillo se midió mediante el uso de un MicroBeta Topcount y se graficó el valor cpm (eje y) contra la concentración de los artículos de prueba (eje x).

5 Análisis estadísticos:

Se determinaron IC_{50} e IC_{90} mediante el ajuste de los datos a una curva a una función de dosis-respuesta sigmoide de 4 parámetros mediante el uso del software GraphPad Prism 6. Las medias geométricas se calcularon a través de tres experimentos y se muestran en la Tabla 19.

Resultados

Los resultados mostraron que el Compuesto B parece ser aproximadamente 2 veces más potentes en comparación con un anticuerpo de control 3 cuando se comparan los valores IC_{50} e IC_{90} .

Tabla 19. Valores de la media geométrica IC_{50} e IC_{90} para la inhibición del BAFF humano en un ensayo de proliferación de linfocitos B humanos

ID del Compuesto	IC_{50} (pM)	IC_{90} (pM)
Compuesto B	33.7	160.2

5

Ejemplo 19. Inhibición de la cantidad de linfocitos B B220+ inducida por la sobreexpresión de BAFF humano en ratones

10 B10.RIII

Materiales y métodos

En resumen, en el día 1, se dividieron aleatoriamente ratones
15 hembra B10.RIII (de 6-8 semanas, Jackson Laboratory) en 10
grupos, 10 animales/grupo y se les proporcionó una inyección
intraperitoneal de 100 µl de amortiguador de citrato (NaCitrato
20 mM, NaCl 115 mM, pH 6.0) o compuestos de prueba a una dosis
molar equivalente de 1.3, 0.4 y 0.13 mg/kg con respecto a 1, 3
20 y 0.1 mg/kg, respectivamente. Los ratones no tratados
previamente constituyeron el control adicional. Inmediatamente
después del tratamiento en el día 1, se les administró a los
ratones una dosis de 3 mg única (1.5 mg/mL) de ADN de
minicírculos de BAFF humano (System Biosciences) mediante

inyección hidrodinámica contra un grupo de control de vector vacío (EV). El tratamiento intraperitoneal con amortiguador de citrato o compuestos de prueba se repitió cada 72 horas en los días 3, 6, 9 y 12.

5

En el día 14, los ratones se anestesiaron mediante el uso de isoflurano (Butler Schein) y se sacrificaron mediante descolocación cervical. Los bazos se retiraron y se analizó una suspensión celular mediante citometría de flujo para
10 linfocitos B B220+. Se determinaron las cantidades promedio para cada grupo de tratamiento y se comparó la importancia con el control calculado mediante el uso de ANOVA unidireccional mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los resultados se muestran en la Figura 5.

15

Resultados

Los resultados muestran que el tratamiento durante 14 días con el Compuesto B fue capaz de inhibir significativamente la
20 expansión de linfocitos B B220+ inducida por el ADN de minicírculos de BAFF humano

Ejemplo 20. Inhibición de la liberación de IL17A e IL22 de
ratón inducida por IL23 humana en ratones C57/Bl6

Materiales y métodos

En resumen, se dividieron aleatoriamente ratones hembra C57BL/6
5 (de 7-10 semanas, Charles River) en 8 grupos, 8 animales/grupo
y se les proporcionó una inyección intraperitoneal de 100 μ l
de cada amortiguador de citrato (NaCitrato 20 mM, NaCl 115 mM,
pH 6.0) o compuestos de prueba a una dosis molar equivalente
de 1.3, 0.4 y 0.13 mg/kg con respecto a 1, 3 y 0.1 mg/kg,
10 respectivamente.

Una hora después de que los ratones con dosificación del
compuesto de prueba se anestesiaran mediante isoflurano (Butler
Schain) y se les proporcionara una inyección intradérmica de
15 20 μ l de BSA al 0.1 % (Sigma) control o 15 μ g/ml (0.3 μ g) de
rhIL23 (generada en el laboratorio) diluida en solución salina
(Invitrogen) en ambas orejas. Los estímulos intradérmicos se
repetieron diariamente durante 2 días consecutivos.
Veinticuatro horas después del segundo estímulo, los ratones
20 fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se
extirparon las orejas. El tejido de las orejas se homogeneizó
en 1 ml de amortiguador de homogeneización (HBSS (Gibco);
Triton X-100 al 0.4 % (Sigma); 1X inhibidor de la proteasa
SigmaFast (Sigma)) mediante el uso de un homogeneizador Fast-

Prep 24 de MP Biomedicals. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 4C durante 10 min y se recolectó el sobrenadante. Los sobrenadantes se sometió a ensayo para determinar la presencia de IL17A e IL22 de ratón, mediante el uso de inmunoensayos Quantikine® de IL-17 de ratón e IL-22 de ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems). Se determinaron los valores en pg/ml de la citocina interpolada para cada muestra. Se determinaron los niveles de pg/ml promedio para cada grupo de tratamiento y se comparó la importancia con el control calculado mediante el uso de ANOVA unidireccional mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

Resultados

15

Los resultados en la Figura 6 muestran que el tratamiento con una dosis intraperitoneal única del Compuesto B fue capaz de inhibir significativamente la liberación de IL17 e IL22 de ratón en la piel inducida con dos inyecciones intradérmicas consecutivas diarias de IL23 humana recombinante.

20

SECUENCIAS

5

10

15

20

SEQ ID NO	Secuencia
1	QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPM FGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSED TAVYYCARSRDLLLFP HH ALSPWGRGTMVTVSS
2	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFSGGTELTVL
3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYIYPR DDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMESSLRSED TAVYYCAIPDRSGYAWFI YWGQGTLVTVSS
4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIK
5	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFSGGTELTVL GGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMESSLRSED TAVYYCAIPD RSGYAWFIYWGQGTLVTVSSLGGS GASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYI TREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5	6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GSGGGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEW MGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSED TAVYYCARSRD LLLFPFHHALSPWGRGTMVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GSGGGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEW MGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSED TAVYYCARSRD LLLFPFHHALSPWGRGTMVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL YITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20	8	SSELTDQPAVSVALGQTVRVTCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTETVL GSGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPD RSGYAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

10

15

20

9	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNR PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELT VLGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQ GLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AIPDRSGYAWFIYWGGQTLVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEV AALEKLEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQG LEWMGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDTAVYYCA RSRDLLLFPHHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKE KVAALKE
11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQG LEWMGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDTAVYYCA RSRDLLLFPHHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEK EVAALEKLEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5	12	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELTVL GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPD RSGYAWFIYWGGQTLVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
10	13	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELTVL GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPD RSGYAWFIYWGGQTLVTVSSLGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITRE PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
20	14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEW MGGIIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSED TAVYYCARSRD LLLFPHHALSPWGRGTMVTVSSLGSGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5	15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GSGSGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEW MGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSED TAVYYCARSRD LLLFPHHALSPWGRGTMVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
15	16	SSELTDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELTVL GGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPD RSGYAWFIYWGGTLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5	17	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELTVL GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPD RSGYAWFIYWGQGLTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLG
10	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEW MGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSED TAVYYCARSRD LLLFPFHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAAL KE
15	19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEW MGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSED TAVYYCARSRD LLLFPFHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAAL EKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLG
20		

5

20	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNN RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWWFGGGTE LTVLGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQA PGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTTLVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAA LKEKVAALKE
21	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAS TRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKL EIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAP GQGLEWMGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA YYCASGAFDYWGQGTTLVTVSSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATS SLDSGVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTTYCLQYASSPFTFGQGTKL EIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAP GQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA YYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTTLVTVSSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

15

20

23	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEW MGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAF DYWGQGTTTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKLEPKSSD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSSL DSGVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTTYCLQYASSPFTFGQGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEW IGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDR SGYAWFIYWGGTLTVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEW MGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAF DYWGQGTTTVTVSSSLGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSS LD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQG LEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA IPDRSGYAWFIYWGGQGLVTVSSLGSGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQG LEWMGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA SGAFDYWGQGT TVTVSSGGCGGGEVAACEKEVA ALEKEVA ALEKEVA ALEKES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLG
28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSS LD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQG LEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA IPDRSGYAWFIYWGGQGLVTVSSGGCGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVA ALKE

29	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQG LEWMGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA SGAFDYWGQGTTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYI TREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNHWYQQKPGKAPKRLIYATSS LD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQG LEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA IPDRSGYAWFIYWQGTLTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

10

15

20

31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEW MGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAF DYWGQGTTTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKLEPKSSD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSPDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
32	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWKYQQKPGKAPKRLIYATSSL DSGVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEW IGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDR SGYAWFIYWGGQTLTVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEW MGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAF DYWGQGTTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGL

5

34	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDIGNRLNWKYQKPGKAPKRLIYATSS LD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVTTYCLQYASSPFTFGQGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQG LEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA IPDRSGYAWFIYWGQGTTLVTVSSLGSGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASRDVAIAVAWYQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQG LEWMGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SGAFDYWGQGTTLVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLG
36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDIGNRLNWKYQKPGKAPKRLIYATSS LD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVTTYCLQYASSPFTFGQGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQG LEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA IPDRSGYAWFIYWGQGTTLVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVA ALKE

10

15

20

37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPQGQLEW IGRIDPNNGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGED LLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVKDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLY ITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNR YTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPQGQLEW IGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDR SGYAWFIYWQGTTLVTVSSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPQG LEWIGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA RGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKE VAALEKLEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSKSN RYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPQG LEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA IPDRSGYAWFIYWGQGTLVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVA ALKE
41	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPQG LEWIGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA RGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

5

42	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNR YTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEIKG GSGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEW IGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPDR SGYAWFIYWQGQTLVTVSSLGSGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GSGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPQGQGLEW IGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGED LLIRTDALDYWGQGTSVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALE KESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLG
44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNR YTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEIKG GSGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEW IGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPDR SGYAWFIYWQGQTLVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

10

15

20

45 5 10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQAPGQGLEW IGRIDPNNGATKYNEKFESRVMTTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARGED LLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSLGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLY ITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
46 15 20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSKSNR YTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTKLEIKG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEW IGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDR SGYAWFIYWGGQTLTVTVSSLGSGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5	47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGV PSRFGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGQ VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNSGATK YNEKFESRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTS VTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKLEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10	48	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQONAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNRYTGV PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTKLEIKGGGSGGGGQ VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYIYPRDDSPK YNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGLT VSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
15	49	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGV PSRFGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGQ VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNSGATK YNEKFESRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTS VTVSSLGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
20		

5

10

15

20

50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSK SNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGGQTLVTVSSLGSGSGRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVR QAPGQGLEWIGRIDPNSGATKYNEKFESRVMTMRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAAL EKEVAALEKEVAALEKESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYI TREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
52	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSK SNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGGQTLVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKE KVAALKEKVAALKE

5

10

15

20

53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYAT SSLDSGVPSRFSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
54	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSRSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVR QAPGQGLEWMGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVVKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCASGAFDYWGQGTITVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

5

10

15

20

55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYAT SSLD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTLLTVVSSLGSGSGASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLG
56	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVR QAPGQGLEWMGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCASGAFDYWGQGTITVTVSSLGSGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

10

15

20

57	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWHYQQKPGKAPKRLIYAT SSLDSGVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTTYCLQYASSPFTFGQGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGGTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
58	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVR QAPGQGLEWMGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCASGAFDYWGQGTITVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5	59	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWFYQQKPGKAPKRLIYATSSL DSGVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVITYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIKG GSGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEW IGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDR SGYAWFIYWGQGTLLTVVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
15	60	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKG GSGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEW MGEIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGAF DYWGQGTITVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

5

10

15

20

61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSKSN RYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQG LEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA IPDRSGYAWFIYWGQGTLTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWAST RHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI KGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPQG LEWIGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSR LRSDD TAVYYCA RGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

10

15

20

63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSK SNRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGGQTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLG
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVR QRPQGQLEWIGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

10

15

20

65	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSK SNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTLLTVVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
66	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGT KLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVR QAPGQGLEWIGRIDPNSGATKYNEKFESRVMTTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

10

15

20

67	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSK SNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGT KLEIKGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMR QAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGGQGLVTVSSLGGSGASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLG
68	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGT KLEIKGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVR QAPGQGLEWIGRIDPNSGATKYNEKFESRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSLGGSGSRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	GGGSGGGG
70	LGGGSG
71	FNRGEC
72	VEPKSC

5

10

15

20

73	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKV DKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
74	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKV DKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
75	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
76	EPKSCDKTHTCPPCP

5	77	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	78	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	79	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20	80	MDDSTEREQSRLTSLCKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLALLSCCLTVVSFYQVAALQGDLASLRAELQGHHAEKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKI FEPPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAALEEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL

5	81	MLGSRVAMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMD LREEGDEETTNDVPHIQCGDGDQPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFT GEPsLLPDSPVGQLHASLLGLSOLLQPEGHHWETQQIPSLSPSPWQRLLLRFKI LRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP
	82	GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
	83	GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
10	84	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMGEIFPGS GTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAFDYWGQGTTV TVSS
	85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSSLD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVITYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIK
	86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMGEIFPGS GTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAFDYWGQGTTV TVSS
15	87	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIGNRLNWWYQQKPGKAPKRLIYATSSLD SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVITYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIK
	88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFSTFFIHWVRQRPQGQGLEWIGRIDPNS GATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALD YWGQGTSTVTVSS
	89	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSKSNRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGGTKLEIK
20	90	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFSTFFIHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNS GATKYNEKFESRVMTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALD YWGQGTSTVTVSS

5

10

15

20

91	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSKSNR YTGVPSPRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTKLEIK
92	GGTFNNNAIN
93	GIIPMFGTAKYSQNFQG
94	SRDLLLFPHHALSP
95	QGDSLRSYYAS
96	GKNNRPS
97	SSRDSSGNHWV
98	GYTFTDQTIH
99	YIYPRDDSPKYNENFKG
100	PDRSGYAWFIY
101	KASRDVAIAVA
102	WASTRHT
103	HQYSSYPFT
104	DHIFSIHWMQ
105	EIFPGSGTTDYNEKFKG
106	GAFDY
107	RASQDIGNRLS
108	ATSSLDS
109	LQYASSPFT
110	DHIFSIHWMQ
111	EIFPGSGTTDYNEKFKG
112	GAFDY
113	RASQDIGNRLN
114	ATSSLDS
115	GYSFSTFFIH

5

10

15

20

116	RIDPNSGATKYNEKFES
117	GEDLLIRTDALDY
118	KASQNAGIDVA
119	SKSNRYT
120	LQYRSYPRT
121	GYSFSTFFIH
122	GRIDPNSGATKYNEKFES
123	GEDLLIRTDALDY
124	KASQNAGIDVA
125	SKSNRYT
126	LQYRSYPRT
127	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
128	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5

129	LEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
130	LEPKSSDKTHTCPPCP
131	GCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLPGCKWDLLIKQWVC DPLGGGGGVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
132	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHS GSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYY YFDYWGQGTLVTVSS
133	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDSTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
134	ESKYGPPCPPCP
135	GGCGGG
136	LGGCGGGS

10

15

20

OTRAS MODALIDADES

Todas las características descritas en la presente memoria
5 descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada
característica descrita en la presente memoria descriptiva
puede remplazarse con una característica alternativa que cumpla
el mismo fin o un fin equivalente o similar. Por lo tanto, a
menos que se indique expresamente lo contrario, cada
10 característica descrita es únicamente un ejemplo de una serie
genérica de características equivalentes o similares.

A partir de la descripción anterior, un experto en la técnica
puede determinar fácilmente las características esenciales de
15 la presente descripción y, sin apartarse del espíritu y alcance
de esta, puede realizar diversos cambios y modificaciones en
la descripción para adaptarla a diversos usos y condiciones.
Por lo tanto, otras modalidades también se encuentran dentro
de las reivindicaciones.