Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-121403- -00004-0000
Fecha: 2010-03-03 16:42:30 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 329 CTOINFORMACION Folios: 689

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1 SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

2 SOLICITANTE

Nombre: ABLYNX N.V.
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Bélgica.

Dirección: Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde, Bélgica

Domicilio: Zwijnaarde, Bélgica

Teléfono: 546 09 70 **Fax:** 249 40 70
E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: Luz Clemencia de PAEZ
Dirección: Carrera 4ª No. 72-35
Teléfono: 347 36 11 **Fax:** 217 92 11
E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: 35.456.344 TP 23.555

4 Número de expediente: 07.121.403

5 Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo descriptivo con modificaciones y listado de sencuencias igualmente con modificaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobres estas nuevas modificaciones presentadas.

6 Comprobante de pago No. 10-128 **Fecha:** 05 de enero de 2010

7 Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa por $114.000, por concepto de modificaciones.
☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.
☐ Poderes, si fuere el caso
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.
☒ Copia auténtica de la Sustitución de poder efectuada a mi favor por el Doctor EMILIO FERRERO.

8 NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ **FIRMA:** Luz Clemencia de Páez

C.C. 35.456.344 de Usaquén **T.P.A.** 23.555

SCT

CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

SITE: www.cavelier.com
L: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : ABLYNX N.V.

Poder conferido el : 14/11/2007

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. N° 438.019 de Usaquén

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
03 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N° 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

1610-

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C. 3 - NOV. 2009

Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO,
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C.

Compareció(eron) Emilio Ferreira
William Fernando Ferreira
Maria Clemencia Perez

Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.
79.852.019 Tp 87929
35.462.324 TP 23577

Y declaró(eron) que la(s) firma(s) que aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferreira
Ana Clemencia Perez

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

03 MAR. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NANOBODIES™ (NANOCUERPOS) MEJORADOS CONTRA EL FACTOR ALFA DE NECROSIS DEL TUMOR

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a Nanobodies™ (Nanocuerpos) mejorados contra el factor-alfa de necrosis del tumor (TNF-alfa), así como también a polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente de uno o más de tales Nanocuerpos. [Nota: *Nanobody™, Nanobodies™ y Nanoclone™, son marcas registradas de Ablynx N.V.*]

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales Nanocuerpos y polipéptidos; a métodos para preparar tales Nanocuerpos y polipéptidos; a células hospederas que expresan o son capaz de expresar tales Nanocuerpos o polipéptidos; a composiciones que comprenden tales Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos o células hospederas; y a usos de tales Nanocuerpos, tales polipéptidos, tales ácidos nucleicos, tales células hospederas o tales composiciones, en particular, para propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, tales como los propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico mencionados posteriormente.

Otros aspectos, modalidades, ventajas y aplicaciones de la invención, llegarán a ser más claros a partir de la descripción adicional aquí posteriormente.

El documento WO 04/041862 por el solicitante, se refiere a Nanocuerpos contra TNF-alfa y a la preparación y uso de los mismos, en particular, para la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con y/o mediados por TNF-alfa, tales como inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotitis autoinmune, diabetes tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

Los Nanocuerpos anti-TNF de conformidad con el documento WO 04/041862, pueden ser humanizados y pueden ser monovalentes o multivalentes, el último de los cuales conduce a afinidad incrementada para TNF. Los Nanobodies™ (nanocuerpos) anti-TNF de conformidad con el documento WO 04/041862, pueden también ser multiespecíficos, y pueden estar en particular, en la forma de constructos multiespecíficos que comprenden dos o más Nanocuerpos contra TNF y un Nanocuerpo adicional dirigido contra una proteína del suero, tal como albúmina de suero humana, lo cual conduce a una vida media in vivo incrementada.

5

El documento WO 04/041862, también se refiere a métodos para la preparación de los Nanocuerpos anti-TNF, a ácidos nucleicos o constructos que codifican los Nanocuerpos anti-TNF, así como también a composiciones farmacéuticas que comprenden los Nanocuerpos anti-TNF, los cuales pueden ser adecuados para administración intravenosa, subcutánea, oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal o rectal, o para administración por inhalación. Los Nanocuerpos anti-TNF de conformidad con el documento WO 04/041862, pueden ser usados para propósitos de diagnóstico, opcionalmente en la forma de un kit de partes.

El documento EP 486 526, describe ligandos de enlace TNF-alfa contra un epítope específico de TNF. Entre los ligandos de enlace, se mencionan los anticuerpos de dominio único ("dAbs").

Reiter et al., *J. Mol. Biol.* (1999), 290, 685-698, describe anticuerpos de dominio único contra TNF-alfa, obtenidos a partir de una biblioteca de exhibición de fago aleatorizada, que se generó partiendo de un andamiaje de dominio VH a partir de un hibridoma de ratón.

El documento WO 00/29004, describe anticuerpos de dominio único de murina ("microcuerpos"), contra TNF-alfa.

El documento WO 04/003019 *entre otras cosas*, describe ligandos que comprenden un primer dominio de enlace contra TNF-alfa y un segundo dominio de enlace contra una proteína del suero, tal como albúmina de suero.

6.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Es un objeto general de la presente invención, proporcionar Nanocuerpos contra TNF-alfa, en particular, contra TNF-alfa humano.

En particular, es un objeto de la presente invención, proporcionar Nanocuerpos contra TNF-alfa, en particular, contra TNF-alfa humano, y proporcionar proteínas o polipéptidos que comprenden los mismos, que son adecuados para uso terapéutico y/o de diagnóstico, y en particular, para la prevención, tratamiento y/o diagnóstico de una o más enfermedades y trastornos asociados con y/o mediados por TNF-alfa, tal como aquellos mencionados anteriormente, y/o que pueden ser usados en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una o más enfermedades asociadas con y/o mediadas por TNF-alfa, tales como aquellas mencionadas anteriormente.

Más en particular, es un objeto de la invención, proporcionar Nanocuerpos contra TNF-alfa, y proporcionar proteínas y polipéptidos que comprenden los mismos, que son ya sea una alternativa a los Nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descrito en el documento WO 04/041862 y/o que tienen una o más propiedades o características mejoradas, comparadas con los Nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descrito en el documento WO 04/041862.

Más en particular, es un objeto de la invención, proporcionar Nanocuerpos contra TNF-alfa, y proporcionar proteínas o polipéptidos que comprenden el mismo, que son

mejorados comparados con los Nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descrito en el documento WO 04/041862, con respecto a una o más de las siguientes propiedades o características:

- afinidad incrementada para TNF-alfa, ya sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o aquí posteriormente);
- mejor adecuabilidad para formatear en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente);
- mejor adecuabilidad para formatear en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o aquí posteriormente);
- adecuabilidad o susceptibilidad mejorada para sustituciones "humanizantes" (como se define en este documento); y/o
- menos inmunogenicidad, ya sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o aquí posteriormente), en un formato monovalente;
- estabilidad incrementada, ya sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en

un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o aquí posteriormente), en un formato monovalente;

- especificidad incrementada hacia TNF-alfa, ya sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o aquí posteriormente), en un formato monovalente;
- actividad cruzada reducida o en donde se desee, incrementada con TNF-alfa a partir de especies diferentes;

y

- una o más propiedades mejoradas deseables para uso farmacéutico (que incluye, uso profiláctico y/o uso terapéutico) y/o para uso de diagnóstico (que incluye pero no se limita al uso para propósitos de formación de imagen), ya sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o aquí posteriormente).

Estos objetos se logran por Nanocuerpos, proteínas y polipéptidos descritos en este documento. Estos Nanocuerpos también son referidos en este documento como "*Nanocuerpos de la invención*"; y estas proteínas y polipéptidos, también son

colectivamente referidos aquí como *"polipéptidos de la invención"*.

Puesto que los Nanocuerpos y polipéptidos descritos en este documento son principalmente propuestos para uso terapéutico y/o de diagnóstico, se dirigen contra (como se define aquí), TNF-alfa humano. Sin embargo, no se excluye (pero también no se requiere), que los Nanocuerpos y polipéptidos descritos en este documento, muestren reactividad cruzada con TNF-alfa a partir de una o más de otras especies de animales de sangre caliente, por ejemplo, con TNF-alfa a partir de una o más de otras especies de primates y/o con TNF-alfa a partir de una o más especies de animales que son a menudo, usados en modelos de animal para enfermedades (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo o perro), y en particular, en modelos animales para enfermedades y trastornos asociados con TNF-alfa (tal como las especies y modelos animales mencionados en este documento). En este sentido, será claro para las personas expertas, que tal reactividad cruzada, cuando se presenta, puede tener ventajas a partir de un punto de vista de desarrollo de fármaco, puesto que permite a los Nanocuerpos y polipéptidos, contra el TNF-alfa humano, ser probados en tales modelos de enfermedad.

La presente invención está en su sentido más amplio también no limitada particularmente a, o definida por un determinante antigénico específico, epítope, parte, dominio, subunidad o confirmación (en donde sea aplicable) de TNF-alfa

contra la cual los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se dirigen.

Sin embargo, en una modalidad preferida, los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en este documento, se dirigen contra y/o pueden enlazarse a un epítope de TNF-alfa que cae en, y/o forma parte del(los) sitio(s) de enlace del receptor TNF (por ejemplo, los sitios de enlace para el TNF-RI, THF-RII, también conocidos como p55 ó p75). Como es bien sabido en la técnica, un trímero de TNF comprende tres sitios de enlace al receptor, los cuales son esencialmente equivalentes y los cuales son formados por/en la interfaz de dos monómeros de TNF con el trímero de TNF. Por ejemplo, los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en este documento, son preferiblemente dirigidos contra, y/o pueden enlazarse a un epítope de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácido de TNF-alfa: Gln en la posición 88, Lys en la posición 90, y/o Glu en la posición 146).

En particular, los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en este documento, son dirigidos contra y/o pueden enlazarse a un epítope del trímero de TNF-alfa, el cual confía en, y/o forma parte del(los) sitio(s) de enlace al receptor de TNF. Por ejemplo, los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos aquí, pueden ser dirigidos contra y/o pueden enlazarse a un epítope del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 y Lys en la posición 90 en un primer

monómero de TNF (referido en este documento como "monómero A"), y Glu en la posición 146 en un segundo monómero de TNF (referido aquí como "monómero B") (en el cual, el monómero A y monómero B juntos, en el trímero de TNF, forman el(los) sitio(s) de enlace al receptor de TNF).

Más particularmente, los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en este documento, pueden ser dirigidos contra y/o pueden enlazarse a un epítope del trímero de TNF-alfa, que comprende los aminoácidos mencionados anteriormente (Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B), y además, al menos uno, preferiblemente dos o más, más preferiblemente 5 ó más, y preferiblemente todo o esencialmente todos, los siguientes residuos de aminoácido del monómero de TNF-alfa A: Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ile en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 115, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

Alternativamente, los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en este documento, pueden ser dirigidos contra y/o pueden enlazarse a un epítope de TNF-alfa, que comprende los aminoácidos mencionados anteriormente (Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B), y además, al menos uno, preferiblemente dos o más, más preferiblemente 5 ó más, y preferiblemente todo o esencialmente todos, los siguientes residuos de aminoácido del monómero de TNF-alfa A: Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, Ile en la posición 97, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137, y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición 33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

Tales epítopes pueden ser delineados de análisis estructural del nanocuerpo cristalizado en el complejo con la molécula de TNF, o de otros procedimientos tales como el mapeo de epítope vía análisis de pepscan.

Por comparación, de los datos cristalográficos (no mostrados), se puede observar que el Nanocuerpo 3E del documento WO 04/041862 enlazado a un epítope diferente (es decir, un epítope que comprende Tyr en la posición 141, Asp en la posición 140, Gln en la posición 67, Gly en la posición 24 y Glu en la posición 23), que el epítope preferido de la

invención.

De este modo, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un dominio variable de inmunoglobulina (o un fragmento adecuado del mismo), que puede enlazarse a un epítope de TNF-alfa que cae en, y/o forma parte del sitio de enlace al receptor de TNF, y preferiblemente, a un epítope que comprende al menos, uno, preferiblemente dos o más, y preferiblemente, todos de los siguientes residuos de aminoácido de TNF-alfa: Gln en la posición 88; Lys en la posición 90 y Glu en la posición 146. Tal dominio variable de inmunoglobulina, es preferiblemente un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera, y en particular, un dominio variable de cadena pesada, el cual puede ser cualquiera de un dominio variable de cadena pesada de mamífero, que incluye pero no se limita a, dominios variables de cadena pesada de humano, dominios variables de cadena pesada de ratón y dominios variables de cadena pesada de Camélidos (tales como los dominios variables de cadena pesada a partir de inmunoglobulinas de 4 cadenas de Camélidos o los dominios variables de cadena pesada (dominios de VHH), de los así llamados anticuerpos de cadena pesada). El dominio variable de inmunoglobulina, es preferiblemente, un anticuerpo de dominio o un anticuerpo de dominio único o adecuado para uso como un anticuerpo de dominio (único). Más preferiblemente, el dominio variable de inmunoglobulina es un Nanocuerpo (como se define aquí), y más preferido, pero sin ejemplos limitantes de Nanocuerpos que son adecuados para uso

en este aspecto de la invención son, PMP1C2 (TNF1, SEC ID No: 52) y PMP5F10 (TNF3, SEC ID NO: 60), así como también las variantes humanizadas y otras de los mismos (como se describe aquí adicionalmente).

El dominio variable de inmunoglobulina mencionado anteriormente, también puede ser humanizado (como por ejemplo, y sin limitación), descrito aquí con respecto a Nanocuerpos. La invención también se refiere a proteínas y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente de tales dominios variables de inmunoglobulina, los cuales pueden por ejemplo, ser como se definen en este documento. Alternativamente, tales dominios de variables pueden formar parte de constructos de ScFv, constructos específicos duales, estructuras de anticuerpo o anticuerpo quimérico y otros constructos de inmunoglobulina, como por ejemplo, se revisa por Hoogenboom (Nature Biotechnology (1997), 15:125-126). Preferiblemente, sin embargo, los dominios variables de inmunoglobulina dirigidos contra el epítope anterior, son Nanocuerpos, en tal caso, las proteínas y polipéptidos que comprenden tales Nanocuerpos, pueden ser como se describen adicionalmente en este documento.

De este modo, algunos aspectos preferidos de la invención se refieren a:

I) Un Nanocuerpo el cual se dirige contra el mismo epítope en el trímero de TNF-alfa como Nanocuerpo TNF1 (SEC ID NO: 52).

II) Un Nanocuerpo el cual se dirige contra el mismo epítope

en el trímero de TNF-alfa como Nanocuerpo TNF3 (SEC ID NO: 60).

III) Un Nanocuerpo el cual se dirige contra un epítope del trímero de TNF-alfa que al menos comprenden los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B.

IV) Un Nanocuerpo el cual se dirige contra un epítope del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que además comprende al menos, uno, preferiblemente dos o más, más preferiblemente 5 o más, y preferiblemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa: Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, He en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91. Asn en la posición 92, He en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, He en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr

en la posición 1 15, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

V) Un Nanocuerpo el cual se dirige contra un epítope del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que además comprende al menos, uno, preferiblemente dos o más, más preferiblemente 5 ó más, y preferiblemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa: Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, He en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, He en la posición 97, Glu en la posición 135, He en la posición 136, Asn en la posición 137 y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición 33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) a V) anteriores, los cuales tienen una relación K_{off} para TNF mejor de 2.10^{-3} (1/s), preferiblemente mejor que 1.10^{-3}.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, los cuales tienen un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando las células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo

VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, los cuales tienen un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando las células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 12nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, los cuales tienen un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando las células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, los cuales tienen un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando las células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual es un Nanocuerpo humanizado.

y algunos aspectos preferidos de esta modalidad se refieren a:

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual es un Nanocuerpo humanizado clase

GLEW.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual es un Nanocuerpo humanizado clase GLEW.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103, y el cual es humanizado.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual es un Nanocuerpo de clase GLEW, y el cual contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103, y el cual es humanizado.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual contiene un residuo de Lisina (L) en la posición 108.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual tiene al menos, 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de la SEC ID NO 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) ó 96 (TNF30).
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en el cual

19

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

- o una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; ó

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de

identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o una secuencia de aminoácido que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales:
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
  - CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y en los cuales:

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de

aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y en los cuales

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

13.

- CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales

  - cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo; y/o dicha secuencia de aminoácido preferiblemente contiene solamente sustituciones de aminoácido, y no supresiones o inserciones de aminoácido, comparadas con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores,

y algunos otros aspectos preferidos de esta modalidad que se refieren a:

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual es un Nanocuerpo clase KERE.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, el cual es un Nanocuerpo clase KERE humanizado

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta

V) anteriores, el cual tiene al menos, 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs. 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) ó 98 (TNF33).

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido NYYMG;

y

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG;

y c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR2 es la

secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; CDR2 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácido ILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, en los cuales

- cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo; y/o

- dicha secuencia de aminoácido preferiblemente contiene, solamente sustituciones de aminoácido, y no supresiones o inserciones de aminoácido, comparadas con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.

y con aún algunos otros aspectos particularmente preferidos siendo:

VI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende un o consiste esencialmente de un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores.

VII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de al menos un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores.

VIII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores.

IX) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual es tal que dicha proteína o polipéptido, después de enlazarse a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación de receptor.

X) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos, dos sitios de enlace del receptor de TNF en un trímero de TNF.

XI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, enlazados vía un enlazador adecuado.

XII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, enlazados vía un enlazador adecuado, y el cual es pegilado.

XIII) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual además, comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

XIV) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual además comprende al menos un

Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y el cual es tal que dicha proteína o polipéptido, después de enlazarse a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación de receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación de receptor.

XV) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos, dos sitios de enlace del receptor de TNF en un trímero de TNF.

XVI) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales cada uno de los dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores es enlazado, opcionalmente vía un enlazador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

XVII) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales cada uno de los dos Nanocuerpos de conformidad con

cualquiera de I) hasta V) anteriores es enlazado, opcionalmente vía un enlazador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y el cual es tal que dicha proteína o polipéptido, después de enlazarse a un trímero de TNF, es capaz de enlazarse o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

XVIII) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y el cual además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales cada uno de los dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores es enlazado, opcionalmente vía un enlazador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace del receptor de TNF en un trímero de TNF.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de VI) hasta XVIII) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es un Nanocuerpo humanizado.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de VI) hasta XVIII) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID

NO: 63).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de VI) hasta XVIII) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es uno elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102) ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de VI) hasta XVIII) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de VI) hasta XVIII) anteriores, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos humanizados de conformidad con cualquiera de I) hasta V) anteriores, y una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).

Se debe notar que cuando un Nanocuerpo es mencionado anteriormente por estar "*de conformidad con cualquiera de I) a V) anteriores*", es al menos, de conformidad con uno de I) a V), pueden estar de conformidad con dos o más de I) a V), y puede también, incluir cualquiera o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con cualquiera de I) a V) anteriores. De manera similar, cuando una proteína o polipéptido es mencionado

anteriormente por estar *"de conformidad con cualquiera de VI) a XVIII) anteriores"*, está al menos de conformidad con uno de VI) a XVIII), puede ser de conformidad con dos o más de VI) a XVIII), y puede también incluir cualquiera o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con cualquiera de VI) a XVIII) anteriores.

Está también dentro del alcance de la invención que, en donde sea aplicable, un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, puede enlazarse a dos o más determinantes antigénicas, epítopes, partes, dominios, subunidades o confirmaciones de TNF-alfa. En tal caso, las determinantes antigénicas, epítopes, partes, dominios o subunidades de TNF-alfa a las cuales los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención se enlazan, pueden ser esencialmente el mismo (por ejemplo, si el TNF-alfa contiene porciones estructurales repetidas o está presente como un multímero), o puede ser diferente (y en el último caso, los Nanocuerpos o polipéptidos de la invención pueden enlazarse a tales determinantes antigénicas diferentes, epítopes, partes, dominios, subunidades de TNF-alfa con una afinidad y/o especificidad, la cual puede ser la misma o diferente). También, por ejemplo, cuando existe TNF-alfa en una conformación activada y en una conformación inactiva, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, pueden enlazarse a ya sea una de estas conformaciones, o puede enlazarse a ambas de estas conformaciones (es decir, con una afinidad y/o especificidad la cual puede ser la misma o diferente).

También, por ejemplo, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden enlazarse a una conformación de TNF-alfa en la cual, se unen a un ligando pertinente, pueden enlazarse a una conformación de TNF-alfa en la cual, no se unen a un ligando pertinente, o pueden enlazarse a ambas de tales conformaciones (nuevamente con una afinidad y/o especificidad la cual puede ser la misma o diferente).

También, se espera que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, en general, se enlazarán a todos los análogos, variantes, mutantes alelos, partes y fragmentos de TNF-alfa, sintéticos o que se originan naturalmente, o al menos, a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de TNF-alfa que contienen una o más determinantes antigénicas o epítopes que son esencialmente los mismos con el(los) determinante(s) o epítope(s) antigénicos a los cuales los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se enlaza en TNF-alfa (por ejemplo, en TNF-alfa de tipo nativo). Nuevamente, en tal caso, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden enlazarse a tales análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad de que son los mismos como, o que difieren de (es decir, superior que o inferior que), la afinidad y especificidad con la cual los Nanocuerpos de la invención se enlazan a TNF-alfa (de tipo nativo). También se incluyen dentro del alcance de la invención, que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, se enlazan a algunos análogos, variantes,

33

mutantes, alelos, partes y fragmentos de TNF-alfa, pero no a otros.

En general, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención al menos, se enlazarán a aquellas formas (que incluyen formas monoméricas, multiméricas y asociadas), que son las más relevantes de un punto de vista biológico y/o terapéutico, como será claro para la persona experta.

También, como el TNF-alfa existe en una forma monomérica y en formas multiméricas, y en particular, en formas triméricas, está dentro del alcance de la invención, que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención solamente se enlazan a TNF-alfa en forma monomérica, o que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, además de enlazarse también a una o más de tales formas multiméricas, tales como la forma trimérica de TNF; o pueden solamente enlazarse a tal forma multimérica (por ejemplo trimérico). De este modo, en general, cuando en esta descripción se hace referencia a un Nanocuerpo, proteína o polipéptido que es dirigido contra TNF-alfa, se debe entender que este también comprende Nanocuerpos dirigidos contra el TNF-alfa en su forma trimérica (que incluye pero no se limita a, Nanocuerpos contra los sitios de enlace al receptor (por ejemplo, los sitios de enlace para TNF-RI, THF-RII, también conocido como p55 ó p75) de tal trímero). En todos estos casos, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden enlazar a tales multímeros o complejos de proteína asociada con una afinidad y/o especificidad que pueden ser el mismo o

diferentes de (es decir, superior o inferior), que la afinidad y/o especificidad con la cual, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se enlazan a TNF-alfa en su estado monomérico y no asociado.

También, en general, los polipéptidos de la invención que contienen dos o más Nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa, pueden enlazarse con avidez superior que los Nanocuerpos o Nanocuerpo monomérico correspondiente.

Por ejemplo, y sin limitación, una proteína multivalente (como se define en este documento) o polipéptido que contiene dos o más Nanocuerpos que se dirigen contra diferentes epítopes de proteína o polipéptido multivalente TNF-alfa (como se define en este documento), que contiene dos o más Nanocuerpos que se dirigen contra epítopes diferentes de TNF-alfa, pueden enlazarse a TNF-alfa con avidez superior que los monómeros correspondientes.

De manera más importante, una proteína o polipéptido multivalente (como se define en este documento), que contiene dos o más Nanocuerpos que se dirigen contra TNF-alfa (y usualmente) se enlazarán con avidez superior a un multímero de TNF-alfa que a un monómero de TNF-ala, y usualmente también se enlazarán con avidez superior que los Nanocuerpos monoméricos correspondientes. En tal proteína o polipéptido multivalente, los dos o más Nanocuerpos pueden por ejemplo, ser dirigidos contra los mismos epítopes, sustancialmente epítopes equivalentes, o diferentes epítopes. En una modalidad de tal proteína o polipéptido multivalente,

35

los dos o más Nanocuerpos pueden ser los mismos (y por lo tanto, ser dirigidos contra el mismo epítope).

El último es de particular importancia, como se sabe que el modo primario de la transducción de señal por TNF involucra reticulación por receptores de TNF por un trímero de moléculas de TNF, los cuales contienen tres sitios de enlace al receptor (véase por ejemplo, Peppel et al., *J. Exp. Med.*, 174 (1991), 1483-1489; Engelmann et al., *J. Biol. Chem.*, 265 (1990), 14497; Smith and Baglioni, J. *Biol. Chem.*, 264 (1989), 14646). Por ejemplo, como se describe por Peppel et al., un dominio extracelular monovalente diseñado por ingeniería del receptor de TNF- el cual fue solamente capaz de bloquear un sitio de enlace al receptor único en un trímero de TNFa, -fue incapaz de prevenir la reticulación de los receptores de TNF por los restantes dos sitios de enlace al receptor; mientras una proteína diseñada por ingeniería que comprende dos de tales dominios extracelulares - de este modo siendo capaz de bloquear dos sitios de enlace al receptor -proporciona una eficacia sorprendente, comparada con el dominio extracelular monovalente.

En la presente invención, se ha encontrado que los Nanocuerpos monovalentes, son capaces de enlazarse a TNF-alfa en tal forma que, la actividad del TNF se reduce, tanto en modelos in vitro, en modelos celulares como en modelos ex vivo (véase la Sección Experimental abajo). Aunque la invención no está limitada a cualquier mecanismo, explicación o hipótesis específica, se asume que debido a su tamaño más

pequeño y alta afinidad para TNF-alfa, dos o tres Nanocuerpos monovalentes de la invención, son capaces de ocupar simultáneamente dos o tres diferentes sitios de enlace al receptor en el trímero de TNF, de este modo, previniendo al trímero de iniciar la reticulación del receptor y con ello, iniciar la transducción de la señal (sin embargo, otros mecanismos de acción no son excluidos: por ejemplo, dependiendo del epítope contra el cual se dirige, un Nanocuerpo de la invención también puede inhibir la asociación de TNF en el estado trimérico).

Se debe notar también que, además o como una alternativa para enlazarse a dos o más sitios de enlace al receptor en un trímero de TNF-único, las proteínas o polipéptidos de la presente invención que comprenden o esencialmente consisten de dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos), que son dirigidos contra epítopes de TNF-alfa, pueden enlazar epítopes (por ejemplo, intramolecularmente), en dos moléculas de TNF-alfa separadas (por ejemplo, dos trímeros separados).

Sin embargo, de conformidad con una modalidad particularmente preferida, la invención se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o esencialmente consiste de dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos), que son cada uno dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (y en particular, del trímero de TNF-alfa), que caen en y/o forman parte del(los) sitio(s) de enlace(s) del receptor del trímero de TNF, de

37

manera tal que dicho polipéptido, después de enlazarse a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

En particular, de conformidad con esta modalidad preferida, la invención se refiere a un polipéptido de proteína que comprende o esencialmente consiste de dos o más dominios variables de inmunoglobulinas (o fragmentos adecuados de los mismos), que son cada uno, dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (y en particular, del trímero TNF-alfa), que caen en y/o forman parte del(los) sitio(s) de enlace al receptor del trímero de TNF, en donde dichos dominios variables de inmunoglobulina son ligados entre sí en tal forma que la proteína o polipéptido, son capaces de enlazarse simultáneamente a dos o más sitios de enlace al receptor en un trímero de TNF único (en otras palabras, es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos, dos sitios de enlace al receptor de TNF en un trímero de TNF). En esta modalidad, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina, son preferiblemente como se definen anteriormente y son más preferiblemente, Nanocuerpos (ya que la proteína o polipéptido es un constructo de Nanocuerpo multivalente, como se describe en este documento adicionalmente). También, en esta modalidad, los dos o más dominios variables de inmunoglobulinas, pueden ser los mismos o diferentes; y pueden ser dirigidos contra epítopes

diferentes con el(los) sitio(s) de enlace al receptor de TNF, pero son preferiblemente, dirigidos contra el mismo epítope.

En un aspecto preferido de esta modalidad, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina, son dirigidos contra epítopes del trímero de TNF-alfa, en el cual, los epítopes caen y/o forman parte del(los) sitios de enlace del receptor de TNF. Por ejemplo, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina son preferiblemente, dirigidos contra y/o pueden enlazarse a un epítope del trímero TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 y Lys en la posición 90 en un primer monómero de TNF (referido en este documento como "monómero A"), y Glu en la posición 146 en un segundo monómero de TNF (referido aquí como "monómero B") (en el cual, el Monómero A y el Monómero B en conjunto, en el trímero de TNF, forman el(los) sitio(s) de enlace al receptor de TNF.

Como se describe además abajo en más detalles con respecto a Nanocuerpos, en tal proteína o polipéptido, al menos, dos dominios variables de inmunoglobulina son preferiblemente ligados en tal forma que la distancia entre el N-término y el C-término de los dos dominios variables de inmunoglobulina, presentes en tal proteína o polipéptido, son preferiblemente al menos, 50 Angstroms, y más preferiblemente, en la región de 55-200 Angstroms, y más preferiblemente en la región de Angstroms, y en particular en la región de 65-150 Angstroms.

En un aspecto particularmente preferido de esta

modalidad, estas dos o más secuencias de inmunoglobulina son Nanocuerpos y son preferiblemente elegidos a partir de los Nanocuerpos descritos en este documento. Algunos Nanocuerpos particularmente preferidos para uso en esta modalidad de la invención son PMP1C2 (TNF1, SEC ID NO:52) y/o PMP5F10 (TNF3, SEC ID NO:60), así como también variantes humanizadas y otras de las mismas (como se describe en este documento); con PMP1C2 (TNF1, SEC ID NO:52) y sus variantes humanizadas siendo particularmente preferidas.

Por consiguiente, la presente modalidad será ahora descrita en más detalle con referencia a Nanocuerpos. Sin embargo, será claro para la persona experta, que las enseñanzas de este documento, pueden ser aplicadas análogamente a dominios variables de inmunoglobulinas.

En esta modalidad de la invención, las dos o más secuencias de inmunoglobulina usualmente, serán ligadas vía uno o más enlazadores adecuados, en los cuales, los enlazadores son tal que cada secuencia de inmunoglobulina puede enlazarse a un sitio de enlace al receptor diferente en el mismo trímero de TNF. Los enlazadores adecuados dependerán entre otras cosas, de (la distancia entre) los epítopes en el trímero de TNF en el cual las secuencias de inmunoglobulina se enlazan, y será claro para la persona experta basada en la descripción de este documento, opcionalmente después de algún grado limitado de experimentación de rutina. Por ejemplo, cuando dos o más secuencias de inmunoglobulina son anticuerpos o Nanocuerpos de dominio (único), enlazadores

adecuados pueden ser elegidos a partir de los enlazadores descritos en este documento, pero con una longitud de enlazador que es tal que los dos o más anticuerpos o Nanocuerpos de dominio (único), pueden cada uno, enlazarse a un sitio de enlace al receptor diferente en el mismo trímero.

También, cuando dos o más secuencias de inmunoglobulina que se enlazan a los sitios de enlace al receptor de TNF-alfa son anticuerpos o Nanocuerpos de domino (único), pueden también ser ligados entre sí, vía un tercer anticuerpo o Nanocuerpo de dominio (único) (en el cual, las dos o más secuencias de inmunoglobulina pueden ser ligadas directamente al tercer anticuerpo/Nanocuerpo de dominio (único) o vía enlazadores adecuados). Tal tercer anticuerpo o Nanocuerpo de dominio (único) puede por ejemplo, ser un anticuerpo o Nanocuerpo de dominio (único) que se proporciona para una vida media incrementada, como se describe además, en este documento. Por ejemplo, el anticuerpo o Nanocuerpo de dominio tardío (único), puede ser un anticuerpo o Nanocuerpo de dominio (único) que es capaz de enlazarse a una proteína del suero (humana), tal como albúmina de suero (humana), como se describe además posteriormente.

Alternativamente, dos o más de las secuencias de inmunoglobulina que se enlazan al(los) sitios de enlace al receptor de TNF-alfa, pueden ser ligadas en serie (ya sea directamente o vía un enlazador adecuado) y el tercer anticuerpo o Nanocuerpo de dominio (único), (el cual puede proporcionar una vida media incrementada, como se describe

41

anteriormente), puede ser conectado directamente o vía un enlazador a una de estas dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas anteriormente. Algunos ejemplos no limitantes de tales constructos son los constructos de las SEC ID Nos: 93 ó 94.

En particular, se ha encontrado en la invención (véase los datos de cristalografía referidos en este documento), que cuando los Nanocuerpos presentes en una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífico de la invención se enlazan al epítope particular descrito anteriormente (el cual es el epítope de TNF1 y sus variantes humanizadas, así como también del TNF3 y sus variantes humanizadas), entonces, preferiblemente, los dos (o más) anticuerpos anti-TNF presentes en tal proteína o polipéptido, deben ser enlazados en tal forma que la distancia entre el N-término y el C-término de los dos Nanocuerpos anti-TNF presentes en tal proteína o polipéptido, deben ser preferiblemente, al menos de 50 Angstroms, y más preferiblemente, en la región de 55-200 Angstroms, y en particular, en la región de 65-150 Angstroms (con el límite superior siendo menos crítico, y siendo elegido por razones de conveniencia, por ejemplo con una vista a la expresión/producción de la proteína); o más en general, que dicha distancia debe ser tal que permite la proteína o polipéptido para someterse al enlace intramolecular al trímero de TNF (es decir, en lugar del enlace intramolecular). La distancia entre el N-término y el C-

término de dos Nanocuerpos anti-TNF, puede ser determinada por cualquiera de los medios adecuados, tal como por cristalografía o modelado molecular (como se describe en este documento). Estas técnicas en general, también hacen posible determinar si una proteína o polipéptido multivalente específico o multiespecífico, es capaz de proporcionar modelado intramolecular. Alternativamente, la presente invención también proporciona un experimento simple usando cristalografía por exclusión de tamaño (como se describe por Santora et al., Anal. Biochem., 299: 119-129), que puede ser usada para determinar si una proteína o polipéptido dado de la invención, proporcionará (predominantemente) el enlace intramolecular a un trímero de TNF o (predominantemente) el enlace intramolecular entre dos o más trímeros de TNF. De este modo, en una modalidad particular de la invención, una proteína o polipéptido de la invención es preferiblemente de manera tal que en este experimento, predominantemente o esencialmente, exclusivamente conduce a enlace intramolecular. Sin embargo, como se enfatiza anteriormente, se debe notar que las proteínas o polipéptidos de la invención que operan vía enlace intramolecular de moléculas de TNF-alfa separadas (por ejemplo, trímeros), también están dentro del alcance de la presente invención.

De este modo, en otro aspecto preferido, la invención proporciona una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífico que comprende al menos, dos Nanocuerpos contra TNF-alfa (y en particular, del trímero de TNF-alfa),

43

en el cual dichos Nanocuerpos son preferiblemente dirigidos a esencialmente el mismo epítope como el Nanobody PMP1C2 (como se mencionó en este documento), y en el cual, al menos dos Nanocuerpos están ligados en tal forma que la distancia entre el N-término y el C-término de al menos, dos Nanocuerpos anti-TNF es tal, que la proteína o polipéptido es capaz de someterse a enlace intramolecular (como se describe aquí), con un trímero de TNF. Preferiblemente, en tal proteína o polipéptido, la distancia entre el N-término y el C-término de dos Nanocuerpos anti-TNF, es al menos, 50 Angstroms, y más preferiblemente, en la región de 55-200 Angstroms, y en particular, en la región de 65-150 Angstroms.

En tal polipéptido o proteína preferidas, los dos o más Nanocuerpos pueden ser ligados en cualquier forma adecuada, tan pronto como la distancia preferida entre el N-término y el C-término de al menos dos Nanocuerpos anti-TNF se pueda lograr, y/o tan pronto como la proteína o polipéptido sea capaz de someterse a enlace intramolecular (como se describe en este documento), con un trímero de TNF.

Por ejemplo, en su forma más simple, al menos dos Nanobodies son directamente ligados vía un enlazador o espaciador adecuado que proporciona la distancia preferida entre el N-término y el C-término de al menos, dos Nanocuerpos anti-TNF y el cual puede permitir a la proteína o polipéptido, someterse a enlace intramolecular (como se describe en este documento), con un trímero de TNF. Los enlazadores adecuados son descritos en este documento, y

pueden - por ejemplo y sin limitación -, comprender una secuencia de aminoácido, en la cual, la secuencia de aminoácido preferiblemente tiene una longitud de 14 aminoácidos, más preferiblemente, al menos 17 aminoácidos, tal como una secuencia de aproximadamente 20-40 aminoácidos (en la cual, usando una distancia promedio de 3.5 Angstrom por un aminoácido, corresponde a las longitudes de enlazador de 49 Angstrom, 59.5 Angstroms y aproximadamente 70 Angstroms, respectivamente; con la cantidad máxima de aminoácidos siendo calculada en la misma forma, basada en las distancias mencionadas anteriormente). Preferiblemente, tal secuencia de aminoácido también debe ser tal que permita a la proteína o polipéptido, someterse a enlace intramolecular (como se describe en este documento), con un trímero de TNF.

De este modo, en otro aspecto preferido, la invención proporciona una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífico que comprende, al menos, dos Nanocuerpos contra TNF-alfa (y en particular, del trímero TNF-alfa), en el cual, dichos Nanocuerpos son preferiblemente dirigidos a esencialmente el mismo epítope como Nanocuerpo PMP1C2 (como se menciona en este documento), y en el cual, al menos dos Nanocuerpos son directamente ligados entre sí, usando un enlazador o espaciador adecuado, de manera tal que la distancia entre el N-término y el C-término de al menos dos Nanocuerpos anti-TNF es tal, que la proteína o polipéptido es capaz de someterse a enlace intramolecular (como se describe

45

en este documento), con un trímero de TNF. Preferiblemente, en tal proteína o polipéptido, la distancia entre el N-término y el C-término de dos Nanocuerpos anti-TNF (y con ello, la longitud preferida del enlazador o espaciador) es al menos, 50 Angstroms, y más preferiblemente en la región de 55-200 Angstroms, y en particular, en la región de 65-150 Angstroms.

Más preferiblemente, en este aspecto preferido, el enlazador o espaciador es una secuencia de aminoácido que comprende al menos 14, preferiblemente al menos 17, más preferiblemente al menso 20 aminoácidos (con un límite superior no crítico elegido por razones de conveniencia, siendo aproximadamente 50, y preferiblemente aproximadamente 40 aminoácidos). En una modalidad preferida, pero no limitantes, el enlazador esencialmente consiste de residuos glicina y serina (como se describe además posteriormente). Por ejemplo, un enlazador adecuado es el enlazador GS30 descrito en este documento, el cual comprende 30 residuos de aminoácido.

En otra modalidad, al menos dos Nanocuerpos contra TNF-alfa son ligados entre sí, vía otra porción (opcionalmente vía uno o dos enlazadores), tal como otra proteína o polipéptido. En esta modalidad, puede ser deseable tener la distancia preferida (es decir, como se menciona anteriormente), entre el N-término y el C-término de al menos, dos Nanocuerpos anti-TNF, por ejemplo, de manera tal que la proteína o polipéptido puede todavía someterse a

enlace intramolecular (como se describe en este documento), con un trímero de TNF. En esta modalidad, al menos dos Nanocuerpos pueden ser ligados directamente a otra porción, o usando un enlazador o espaciador adecuado, nuevamente, tan pronto como la distancia preferida y/o enlace intramolecular deseado, pueda todavía lograrse. La porción puede ser cualquier porción adecuada la cual no se detracte (lo suficiente), del enlace de la proteína o polipéptido al TNF y/o de las propiedades farmacológicas o biológicas deseadas de la proteína o polipéptido. Como tal, la porción puede ser esencialmente inactiva o puede ser biológicamente activa, y como tal, puede o no puede mejorar las propiedades deseadas de la proteína o polipéptido y/o puede conferir una o más propiedades deseadas adicionales a la proteína o polipéptido. Por ejemplo, y sin limitación, la porción puede mejorar la vida media de la proteína o polipéptido, y/o puede reducir su inmunogenicidad o mejorar cualquier otra propiedad deseada.

En una modalidad preferida, la porción puede ser otro Nanocuerpo (que incluye pero no se limita al tercer Nanocuerpo contra TNF-alfa, aunque esto no es necesario y usualmente menos preferido), y en particular otro Nanocuerpo que mejora la vida media de la proteína o polipéptido, tal como un Nanocuerpo que es dirigido contra una proteína del suero, por ejemplo, contra albúmina de suero humano. Ejemplos de tales proteínas y polipéptidos son descritos en este documento.

De este modo, en una modalidad, la invención se

47

refiere a un constructo multiespecífico multivalente que comprende, dos o más secuencias de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos), que son cada uno, dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (por ejemplo del trímero TNF-alfa) que cae en y/o forma parte del sitio de enlace al receptor, y que están ligados entre sí, vía al menos, una secuencia de inmunoglobulina que proporciona vida media incrementada (y opcionalmente, vía uno o más enlazadores adecuados), de manera tal que dicho polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF y/o la transducción de la señal que es mediada por dicho trímero de TNF. Tal polipéptido puede ser tal que es dichas dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas anteriormente, pueden cada una, enlazarse a un sitio de enlace al receptor diferente en un trímero de TNF.

En particular, en esta modalidad, el polipéptido puede comprender un Nanocuerpo biespecífico trivalente, que comprende dos Nanocuerpos que son cada uno, dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (y en particular, del trímero de TNF-alfa), que caen en y/o forman parte del sitio de enlace al receptor, en el cual, dichos Nanocuerpos están ligados entre sí vía un tercer Nanocuerpo que proporciona una vida media incrementada (por ejemplo, un Nanocuerpo que se dirige a una proteína del suero tal como albúmina de suero humano), en el cual, cada uno de los dos Nanocuerpos mencionados primero, puede ser directamente ligado a dicho tercer Nanocuerpo o vía

uno o más enlazadores adecuados, de manera tal que dicho polipéptido después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por dicho trímero de TNF. Tal polipéptido puede ser de manera que dichos dos Nanocuerpos mencionados primero, pueden cada uno, enlazarse a un sitio de enlace al receptor diferente en un trímero de TNF. Nuevamente, algunos Nanocuerpos particularmente preferidos para uso en esta modalidad de la invención, son PMP1C2 (TNF1, SEC ID NO:52) y/o PMP5F10 (TNF3, SEC ID NO:60), así como también variantes humanizadas y otras de los mismos (como se describe en este documento); con PMP1C2 (TNF1, SEC ID NO:52) y sus variantes humanizadas, son particularmente preferidos; y los Nanocuerpos dirigidos contra albúmina de suero humano descrito en este documento. Algunos constructos preferidos, pero no limitantes de esta modalidad de la invención son, TNF24 (SEC ID NO:90), TNF 26 (SEC ID NO:92), TNF 27 (SEC ID NO:93), TNF 28 (SEC ID NO:94), TNF 60 (SEC ID NO:417) y TNF 62 (SEC ID NO:418), de los cuales TNF 60 es particularmente preferido.

De este modo, algunos aspectos preferidos de esta modalidad de la invención se refieren a:

XIX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente, de dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que son cada uno dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (y en particular, del trímero TNF-alfa) que cae y/o

forma parte del(los) sitio(s) de enlace al receptor del trímero de TNF, de manera tal que dicho polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

XX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente, de dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que son cada uno dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (y en particular, del trímero TNF-alfa) que cae y/o forma parte del(los) sitio(s) de enlace al receptor del trímero de TNF, de manera tal que dicho polipéptido es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos, dos sitios de enlace del receptor de TNF en un trímero de TNF.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales, dichos dominios variables de inmunoglobulina están ligados entre sí, de forma tal que la proteína o polipéptido es capaz de enlazarse simultáneamente a dos o más sitios de enlace del receptor en un trímero de TNF único.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de enlazarse al mismo epítope como Nanocuerpo TNF1 (SEC ID

NO: 52).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de enlazarse contra el epítope dentro del sitio de enlace del receptor de TNF del trímero de TNF que al menos, comprenden los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de enlazarse contra el epítope dentro del sitio de enlace del receptor de TNF del trímero de TNF que al menos, comprenden los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que además comprende al menos uno, preferiblemente dos o más, más preferiblemente 5 ó más, y preferiblemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa: Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, lie en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91. Asn en la

posición 92, He en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, He en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 115, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de enlazarse contra el epítope dentro del sitio de enlace del receptor de TNF del trímero de TNF que al menos, comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que además comprende al menos uno, preferiblemente dos o más, más preferiblemente 5 ó más, y preferiblemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, He en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, He en la posición 97, Glu en la posición 135, He en la posición 136, Asn en la posición 137 y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición

33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales al menos dos dominios variables de inmunoglobulina están ligados en tal forma que la distancia entre el N-término del primer dominio variable de inmunoglobulina y el C-término del segundo dominio variable de inmunoglobulina presente en tal proteína o polipéptido es al menos de 50 Angstroms.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales la distancia entre el N-término del primer dominio variable de inmunoglobulina y el C-término del segundo dominio variable de inmunoglobulina es entre 55-200 Angstroms.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales la distancia entre el N-término del primer dominio variable de inmunoglobulina y el C-término del segundo dominio variable de inmunoglobulina es entre 65-150 Angstroms.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominio variable de inmunoglobulina están ligados entre sí vía un enlazador o espaciador.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el enlazador o secuencia es una secuencia de aminoácido.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el enlazador

S3

o espaciador está comprendido de al menos 14 residuos de aminoácidos.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el enlazador o espaciador está comprendido de al menos 17 - 50 residuos de aminoácidos.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el enlazador o espaciador consiste esencialmente de residuos de glicina y serina.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el enlazador o espaciador es GS30 (SEC ID NO: 69).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominio variable de inmunoglobulina están ligados entre sí vía otra porción.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dicha otra porción es una porción de proteína o polipéptido.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dichas otras porciones confieren al menos, una propiedad deseada a la proteína o polipéptido, o mejora al menos, una propiedad deseada de la proteína o polipéptido.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dicha otra

porción mejora la vida media de la proteína o polipéptido y/o reduce la inmunogenicidad de la proteína o polipéptido.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales cada uno del primero y segundo dominio variable de inmunoglobulina están ligados a dicha otra porción vía un enlazador o espaciador.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el enlazador o secuencia es una secuencia de aminoácido.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el enlazador o espaciador consiste esencialmente de residuos de glicina y serina.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales dicha otra porción es un Nanocuerpo.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales la otra porción es un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humano.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humano es un Nanocuerpo humanizado.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera

de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humano es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humano es uno elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102) ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO:104).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humano es ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con una relación Koff para TNF mejor de 2.10^{-3} (1/s), preferiblemente mejor que 1.10^{-3} (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera

de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 12nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1,

S7.

bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, los cuales son humanizados;

con algunos aspectos particularmente preferidos de esta modalidad siendo:

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos clase GLEW.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos clase GLEW con un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con al menos 80%, preferiblemente al menos

90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos. 52 (TNF1), 76 (TNF 13), 77 (TNF 14), 95 (TNF29) ó 96 (TNF30).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales:

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido

EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores, en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR2 comprende la secuencia de aminoácido

EINTNGLITKYPDSVKG.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales:
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
- CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY;

61

y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales:

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y en los cuales:

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y en los cuales

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describen para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
  - CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo

dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XDC) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales - cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo

dominios variables de inmunoglobulina son elegidos del grupo que consiste del Nanocuerpo TNF 1 (SEC ID NO: 52) y variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF 1 (SEC ID NO: 52).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son elegidos del grupo que consiste de TNF 13 (SEC ID NO: 76), TNF 14 (SEC ID NO: 77), TNF 29 (SEC ID NO: 95) y TNF 30 (SEC ID NO:96).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son TNF 30 (SEC ID NO:96);

y con algunos aspectos particularmente preferidos de esta modalidad siendo:

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos clase KERE.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido

de las SEC ID Nos. 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) ó 98 (TNF33).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales:

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido NYYMG;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1

diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera

de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) en los cuales CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales:

  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o

  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o

  - CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG;

CDR2 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido ILPLSDDPGWNTY (SEC ID NO:436).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido NYYMG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NYYMG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido NYYMG;

y

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG;

y

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; CDR2 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácido ILPLSDDPGWNTY.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos como se describe para las proteínas o polipéptidos de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales
  - cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
  - dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son elegidos del grupo que consiste del Nanocuerpo TNF 3 (SEC ID NO: 60) y variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF 3 (SEC ID NO: 60).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX), en los cuales el primero y segundo dominios variables de inmunoglobulina son elegidos del grupo que consiste de TNF20 (SEC ID NO: 83), TNF21 (SEC ID NO: 84), TNF 22 (SEC ID NO: 85), TNF23 (SEC ID NO: 86) ó TNF33 (SEC ID NO: 99).

Se debe notar que, cuando una proteína o polipéptido es mencionado anteriormente por estar *"de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores"*,

está al menos, de conformidad con uno de XIX) a XX), y puede estar de conformidad con tanto XIX) como XX), y puede también incluir cualquiera o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con cualquiera de XIX) hasta XX) anteriores".

Sin embargo, se debe notar que la invención no está limitada a algún mecanismo de acción o hipótesis específica. En particular, se ha encontrado que los Nanocuerpos monovalentes de la invención, también pueden ser activos en los ensayos y modelos descritos en este documento, los cuales confirman que el enlace intramolecular del trímero de TNF, aunque se prefiere en una modalidad específica de la invención, no se requiere para obtener la acción y efecto deseado de los Nanocuerpos, proteínas y polipéptidos descritos en este documento. De manera similar, también se abarcan dentro del alcance de la invención, que las proteínas y polipéptidos descritos aquí, logran su acción deseada vía cualquier mecanismo apropiado (por ejemplo, por enlace intramolecular, enlace intermolecular o aún, por enlace a TNF monomérico, de este modo, inhibiendo la formación de trímero de TNF).

También está dentro del campo de la invención, usar partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, y/o usar proteínas o polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente de los mismos, tan pronto como estos sean adecuados para usos contemplados en este documento. Tales

partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos, derivados, proteínas y/o polipéptidos, serán descritos en la descripción adicional en este documento.

En otro aspecto, la invención se refiere a un Nanocuerpo (como se define en este documento), contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las cuales:

(i) CDR1 es una secuencia de aminoácido elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR1 de las SEC ID NOS: 15 a 21 o del grupo que consiste de las secuencias CDR1 de las SEC ID NOS: 164 a 197;

o del grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR1 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 15 a 21 ó con al menos una de las secuencias CDR1 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 164 hasta 197, en los cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con

la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores;

y/o del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tiene 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido(s)" (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR1 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 15 hasta 21 ó con al menos una de las secuencias CDR1 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 164 hasta 197, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores; y en las cuales:

(ii) CDR2 es una secuencia de aminoácido elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR2 de las SEC ID NOS: 22 hasta 28 o del grupo que consiste de las secuencias CDR2 de las SEC ID NOS: 232 hasta 265;

o del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR2 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 22 hasta 28 ó con al menos una de las secuencias

CDR2 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 232 hasta 265, en las cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores; y/o del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácidos" (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR2 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 22 hasta 28 ó con al menos una de las secuencias CDR2 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 232 hasta 265, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores;

y en las cuales:

(iii) CDR3 es una secuencia de aminoácido elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR3 de las SEC ID NOS: 29 hasta 33 o del grupo que consiste de las secuencias

CDR3 de las SEC ID NOS: 300-333;

o del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR3 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 29 hasta 33 ó con al menos una de las secuencias CDR3 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 300-333, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores; y/o

del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácidos" (como se define en este documento) o con al menos una de las secuencias CDR3 del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 300-333, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no

78

supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores;

o del grupo que consiste de las secuencias CDR3 de las SEC ID NOS: 34 y 35 ó del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR3 de SEC ID NOS: 34 y 35, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores;

y/o del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácidos" (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR3 de SEC ID NOS: 34 y 35, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con

la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.

Los Nanocuerpos contra TNF-alfa como se describe anteriormente, y como se describe además aquí posteriormente, también son referidos en este documento como Nanocuerpos de la invención.

De los Nanocuerpos de la invención, los Nanocuerpos que comprenden una o más de las CDR explícitamente listadas anteriormente, son particularmente preferidas; los Nanocuerpos que comprenden dos o más de las CDR explícitamente listadas anteriormente, son más particularmente preferidas; y los Nanocuerpos que comprenden tres de las CDR explícitamente listadas anteriormente, son más particularmente preferidas.

Algunas combinaciones particularmente preferidas, pero no limitantes de las secuencias de CDR, pueden verse en la Tabla I abajo, la cual lista las CDR y secuencias de estructuras que están presentes en un número de Nanocuerpos preferidos (pero no limitantes) de la invención. Como será claro para la persona experta, una combinación de secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que ocurren en el mismo clon (es decir, secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales son mencionadas en la misma línea en la Tabla I), usualmente serán preferidas (aunque la invención en su sentido más amplio, no está limitada a esto, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias CDR mencionadas en la Tabla I).

También, en los Nanocuerpos de la invención que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas en la Tabla

I, cada CDR puede ser reemplazada por una CDR elegida del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con las CDR mencionadas; en las cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores;

y/o elegida del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido(s)" (como se indica en el párrafo precedente) (como se define en este documento) con una de las CDR(s) mencionadas de la secuencia de aminoácidos anterior, en la cual:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.

Sin embargo, como será claro para las personas

expertas, la (combinación de) secuencias de CDR mencionadas en la Tabla I, en general, será preferida.

Tabla 1: Combinaciones preferidas de estructura y secuencias de CDR

Clon	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
PMP1C2 (TNF1)	13 10	QVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFS	16 04	DYWMY	19 18	WVRQAPGKG LEWVS	23 02	EINTNGLITKYP DSVKG	26 16	RFTISRDNAKNTLYLQMNSL KPEDTALYYCAR	30 00	SPSGFN	33 04	RGQGT QVTVSS
PMP1G11	13 11	QVQLQESGGGMVQPG GSLRLSCAASGFDFG	16 05	VSWMY	19 19	WVRQAPGKG LEWVS	23 03	EINTNGLITKYP DSVKG	26 17	RFTISRDNAKTTLYLQMNSL KPEDTALYYCAR	30 01	SPSGSF	33 05	RGQGT QVTVSS
PMP1H6	13 12	EVQLVESGGGLVQPG *GSLRLSCATSGFDFS*	16 *06*	VSWMY	20 *00*	WVRQAPGKG LEWVS	23 04	EINTNGLITKYV *DSVKG*	26 *18*	RFTISRDNAKNTLYLQMDSL *IPEDTALYYCAR*	30 *02*	SPSGSF	33 06	RGQGT QVTVSS
PMP1G5 (TNF2)	13 13	QVQLVESGGGLVQAG GSLRLSCAASGRTFS	16 07	EPSGYT YTIG	20 01	WFRQAPGKE REFVA	23 05	RIYWSSGLTYY ADSVKG	26 19	RFTISRDIAKNTVDLLMNSL KPEDTAVYYCAA	30 03	RDGIPTSRSV GSYNY	33 07	WGQGT QVTVSS
PMP1H2	13 14	QVKLEESGGGLVQPG DSLRLSCAASGRTFS	16 08	DYSGYT YTVG	20 02	WFRQAPGKE REFVA	23 06	RIYWSSGNTYY ADSVKG	27 00	RFTISRDIAKNTVDLLMNNL EPEDTAVYYCAA	30 04	RDGIPTSRSV ESYNY	33 08	WGQGT QVTVSS
PMP3G2	13 *15*	AVQLVESGGGLVQPG *DSLRLSCAASGRTFS*	16 *09*	DYSGYT *YTVG*	20 *03*	WFRQAPGKE REFVA	23 07	RIYWSSGNTYY ADSVKG	27 01	RFTISRDIAKNTVDLLMNNL EPEDTAVYYCAA	30 05	RDGIPTSRSV ESYNY	33 09	WGQGT QVTVSS
PMP1D2	13 16	AVQLVDSGGGLVQAG GSLRLSCAASGRTFS	17 00	AHSVYT MG	20 04	WFRQAPGKE REFVA	23 08	RIYWSSANTYY ADSVKG	27 02	RFTISRDNAKNTVDLLMNCL KPEDTAVYYCAA	30 06	RDGIPTSRSV EAYNY	34 00	WGQGT QVTVSS

Tabla I (continuación):

Clon	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
PMP3D10	13 7	QVQLVESGGGLVQAGG SLSLSCAASGRSFT	17 1	GYYMG	20 5	WFRQAPG KERQLLA	23 9	SISWRGDNTYYKE SVKG	27 3	RFTISRDDAKNTIYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	30 7	SILPLSDDPG WNTN	34 1	WGQG TQVTV SS
PMP5F10 (TNF3)	13 8	EVQLVESGGGLVQAGG SLSLSCSASGRSLS	17 2	NYYMG	20 6	WFRQAPG KERELLG	24 0	NISWRGYNIYYKDS VKG	27 4	RFTISRDDAKNTIYLQMN RLKPEDTAVYYCAA	30 8	SILPLSDDPG WNTY	34 2	WGQG TQVTV SS
NC55TNF_S1C4	13 9	EVQLVESGGGLVQAGD SLRLSCAASQIIFG	17 3	SHVAA	20 7	WFRQAPG REREFVA	24 1	EIRPSGDFGPEGE FEHVTASLKG	27 5	RFTIAKNSVDNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAA	30 9	APYRGGRDYR WEYEYEY	34 3	WGQG TQVTV SS
NC55TNF_S1C3	14 0	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCKNAGSTSN	17 4	AYATG	20 8	WFRRAPG KEREFVA	24 2	GIQWSGGDAFYRN SVKG	27 6	RFRITRDPDNTVYLQMN DLKPEDTAIYYCAQ	31 0	KLSPYYNDFD SSNYEY	34 4	WGQG TQVTV SS
NC55TNF_S2C1	14 1	EVQLVESGGDLVQPGG SLRLSCAVSGQLFS	17 5	TNDVG	20 9	WYRRAPG KQRELVA	24 3	TITDDGTTDYGDD VKG	27 7	RFVISREGEMVYLEMNS LKPEDTAVYYCNI	31 1	NRLRSTWGIR YDV	34 5	WGQG TQVTV SS
NC55TNF_S2C5	14 2	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCVVSGFTFS	17 6	TTSMT	21 0	WVRQAPG KFEEWVS	24 4	FINSDGSSTTYADS VKG	27 8	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLKPEDTAMYYCGR	32 2	RGYGRD	34 6	RSKGI QVTVA S
NC55TNF_S3C7	14 3	EVQLVESGGGTVQAGD SLRLSCAASGRSFS	17 7	SVAMG	21 1	WFRQAPG KQREFLA	24 5	GVGYDGSSIRYAE SVKG	27 9	RFTIARGNRESTVFLQM ENLKPEDTAVYFCTA	31 3	EPIGAYEGLW TY	34 7	WGQG TQVTV SS

Tabla I (continuación):

Clon	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
NC55TNF_S3C1	14	TNF-ALPHAVESGGGLMQPGGSLKLSCAASGFMFS	178	DSAMG	21	WFRQAPGKEREFVA	46	TISWNGGSSSYADFVKG	80	RFTISRDNAKNTVYLQMNGLTPQDTAIYYCAG	14	SYSNGNPHRFSQYQY	48	WGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1B2	145	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFG	179	TYAMG	31	WFRQAPGKEREFVA	47	AISWGGGSIVYAESAKG	81	RFTISRDNAKXTMYLQMDSLKPEDTAVYYCAA	15	ANNIATLRQGS	99	WGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1D2	146	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRNFV	180	TYAMS	41	WFRRAPGKEREFVA	48	SISWSGDTTYYSNSVKG	82	RFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCAV	16	VQVIDPSWSGVNLDDYDY	50	LGSGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1E2	147	EVQLVESGGRLVQPGGSLRLSCKNAGSTSN	181	AYATG	51	WFRRAPGKEREFVA	49	GIQWSGGDAFYRNSVKG	83	RFRITRDPDNTVYLQMNDLKPEDTAIYYCAQ	17	KLSPYYNDFDSSNYEY	51	WGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1G2	148	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASATISS	182	IVMLG	61	WYRQAPGKQREWVA	50	SITIGSRTNYADSVKG	84	RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCNA	18	VPPRDDY	52	WGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2A2	149	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGQTSS	183	SYDMG	71	WFRQAPGEGREFVA	51	RISGSDGSTYYSDRAKD	85	RFTISRDNTKNMVYLQMDRLKPDDTAVYYCRV	19	PRYENQWSSYDY	53	WGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2C2	150	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFS	184	TYDMS	81	WVRQAPGKGLEWVS	52	GIDSGGGSPMYVDSVKG	86	RFTVSRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAK	20	FSTGADGGSWYWSYGMDS	54	WGKGTQVTVSS

Tabla I (continuación):

Clon	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
NC55TNF_BMP2F2	15	EVQLVESGGGLVQAG DSLRLSCEASERSSN	18 5	RYNMA	21 9	WFRQAPGK EREFLA	25 3	RVDVSGGNT LYGDSVKD	28 7	RFTVSRINGKNAMYLQMNNL KPEDTAIYYCAA	32 1	GGWGTTQYDY DY	35 5	WGQG TQVTV SS
NC55TNF_NC10	15 2	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCVCVSSGCT	18 6	FSAYSMT	22 0	WVRQAPGK AEEWVS	25 4	FINSDGSSTT YADSVNG	28 8	RFKISRDNAKKTLYLQMNSL GPEDTAMYYCQR	32 2	RGYALD	35 6	RGQGT QVTVS S
NC55TNF_NC11	15 3	EVQLVESGGGLVQAG DSLTLSCASSGRGFY	18 7	KNAMG	22 1	WFRQPPGK EREFVA	25 5	SIKWNGNNT YYADSVRG	28 9	RFTISRGNAKNTENTVSLQM NSLKPEDTADYYCAA	32 3	DSSHYSYVYSK AYEYDY	35 7	WGQG TQVTV SS
NC55TNF_NC1	15 4	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCVFSGFAFS	18 8	ASSMA	22 2	WVRQAPGK YEEWVS	25 6	FINSDGSSTT YADSVQG	29 0	RFTISRDNAKNTLYLQMNSL KSEDTAMYYCGR	32 4	RGYGRD	35 8	RSQGI QVTVS S
NC55TNF_NC2	15 5	EVQLVESGGGLVQAG GSLRLSCAASGRTFS	18 9	SYAMG	22 3	WFRQAPGK EREFVA	25 7	AISWSGTITN YADSVKG	29 1	RFTISRDNGKNTVHLQMNSL KPEDTAVYHCAV	32 5	VQPYSGGDYY TGVEEYDY	35 9	WGXG TQVTV SS
NC55TNF_NC3	15 6	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCVVSGFTFS	19 0	ATSMT	22 4	WVRQAPGK AEEWVS	25 8	FINSDGSSTT YADSVKG	29 2	RFTISRDNAKNTLYLQMDDL QSEDTAMYYCGR	32 6	RGYGRD	36 0	RSRGI QVTVS S
NC55TNF_NC5	15 7	EVQLVESGGGLVQAG GSLRLSCAASGGAFS	19 1	NYDVG	22 5	WFRQAPGE GREIVA	25 9	RISGSGDST YSSNRAKG	29 3	RFTISRDNAKNTVYLQMNSL KREDTAVYYCRA	32 7	ARYNGTWSSN DY	36 1	WGQG TQVTV SS

Tabla I (continuación):

Clon	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
NC55TNF_NC6	15 18	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCECVSSGCT	19 2	FSAYSM T	22 26	WVRQAPGKA EEFVS	26 0	FINSDGSSTT YANSVNG	29 4	RFKISRDNAKKTLYLQMNSL GPEDTAMYYCQR	32 8	RGYALD	36 2	RGQGTQ VTVSS
NC55TNF_NC7	15 19	QVQLVESGGGLVQAGGS LRLSCTASGQTSS	19 3	TADMG	22 7	WFRQPPGKG REFVA	26 1	RISGIDGTTY YDEPVKG	29 5	RFTISRDKAQNTVYLQMDSL KPEDTAVYYCRS	32 9	PRYADQW SAYDY	36 3	WGQGTQ VTVSS
NC55TNF_NC8	16 10	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCVVSGFTFS	19 4	TTSMT	22 8	WVRQAPGKF EEWVS	26 2	FINSDGSSTT YADSVKG	29 6	RFTISRDNAKNTLYLQMNSL KPEDTAMYYCGR	33 0	RGYGRD	36 4	RSKGIQV TVSS
NC55TNF_S2C2	16 11	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCVASASGVK	19 5	VNDMG	22 9	WYRQAPGKE RELVA	26 3	TITDDGRTNY EDFAKG	29 7	RFTISRDNAKNTVYLQMNSL LPEDTAVYYCNA	33 1	RTYWAHL PTY	36 5	WGQGTQ VTVSS
NC55TNF_S1C6	16 12	EVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGRSFG	19 6	SVAMG	23 0	WFRQAPGKE REFVA	26 4	AIGYDGNSIR YGDSVKG	29 8	RFTISRDNIKNTMYLEMENL NADDTARYLCAA	33 2	EPLARYE GLWTY	36 6	WGQGTQ VTVSS
NC55TNF_S3C2	16 13	EVQLVESGGGLVQAGASL RLSCTTSTRTN	19 7	DRFNMA	23 1	WFHQAPGKD REFVS	26 5	RIDVAGYNTA YGDFVKG	29 9	RFTVSRDSAENTVVLQMNSL RPEDTGVYYCAA	33 3	GGWGISQ SDYDL	36 7	WGQGTQ VTVSS

98

Notas a la Tabla I:

- ID se refiere a las SEC ID NOs. En el listado de secuencia adjunto.

- Para CDR1: La SEC ID NO:164 corresponde a la SEC ID NO:15, la SEC ID NO:167 corresponde a la SEC ID NO:16; la SEC ID NO:172 corresponde a la SEC ID NO:17, las SEC ID NOS: 165 y 166, corresponden a la SEC ID NO:18, la SEC ID NO:170, corresponde a la SEC ID NO:19, la SEC ID NO:171 corresponde a la SEC ID NO:20, y las SEC ID NOS: 168 y 169, corresponden a la SEC ID NO:21.

- Para CDR2: Las SEC ID NOS:232 y 233, corresponden a la SEC ID NO:22, la SEC ID NO:235 corresponde a la SEC ID NO:23, la SEC ID NO:240 corresponde a la SEC ID NO:24, la SEC ID NO:234 corresponde a la SEC ID NO:25, las SEC ID NOS:236 y 237, corresponden a la SEC ID NO:6, la SEC ID NO:238 corresponde a la SEC ID NO:27, y la SEC ID NO:239 corresponde a la SEC ID NO:28.

- Para CDR3: La SEC ID NO:303 corresponde a la SEC ID NO:29, la SEC ID NO:308 corresponde a la SEC ID NO:30, la SEC ID NO:306 corresponde a la SEC ID NO:31, la SEC ID NO:307 corresponde a la SEC ID NO:32, las SEC ID NOS: 304 y 305 corresponden a la SEC ID NO:33, la SEC ID NO:300 corresponde a la SEC ID NO:34, y las SEC ID NO: 301 y 302 corresponden a la SEC ID NO:35.

De este modo, en los Nanocuerpos de la invención, al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes, es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las Secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I; o del grupo de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de "identidad de secuencia" (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido(s)" (como se define en este documento) con al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I. En este contexto, por "elegida adecuadamente", significa que, conforme es aplicable, una secuencia CDR1 es elegida de las secuencias CDR1 adecuadas (es decir, como se define en este documento), una secuencia CDR2 es elegida de las secuencias CDR2 adecuadas (es decir, como se define en este documento) y una secuencia CDR3 es elegida de las secuencias CDR3 adecuadas (es decir, como se define en este documento), respectivamente.

En particular, en los Nanocuerpos de la invención, al menos la secuencia CDR3 presente es

adecuadamente elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR3 listadas en la Tabla I o del grupo de secuencias CDR3 que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR3 listadas en la Tabla I; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR3 que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con al menos una de las secuencias CDR3 listadas en la Tabla I.

Preferiblemente, en los Nanocuerpos de la invención, al menos dos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes son adecuadamente elegidas del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I o del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido(s)" con al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I.

90

En particular, en los Nanocuerpos de la invención, al menos la secuencia CDR3 presente es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR3 listadas en la Tabla I o del grupo de secuencias CDR3 que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR3 listadas en la Tabla I, respectivamente; y al menos una de las secuencias CDR1 y CDR2 presentes es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las Secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, listadas en la Tabla I o del grupo de secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, listadas en la Tabla I; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con al menos una de las secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, listadas en la Tabla I. Más preferiblemente, en los Nanocuerpos de la invención, las tres secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes son adecuadamente elegidas del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en

la Tabla I o del grupo de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I.

Aún más preferiblemente, en los Nanocuerpos de la invención, al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes, es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las Secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I. Preferiblemente, en esta modalidad, al menos una ó preferiblemente ambas otras dos secuencias de CDR presentes son adecuadamente elegidas de las secuencias CDR que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR correspondientes, respectivamente, listadas en la Tabla I; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con al menos una de las

secuencias correspondientes, respectivamente, listadas en la Tabla I.

En particular, en los Nanocuerpos de la invención, al menos la secuencia CDR3 presente es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las CDR3 listadas en la Tabla I. Preferiblemente, en esta modalidad, al menos una y preferiblemente ambas de las secuencias CDR1 y CDR2 presente son adecuadamente elegidas de los grupos de secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, listadas en la Tabla I, y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con al menos una de las secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, listadas en la Tabla I.

Aún más preferiblemente, en los Nanocuerpos de la invención, al menos dos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes son adecuadamente elegidas del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I. Preferiblemente, en esta modalidad, la secuencia CDR restante presente es adecuadamente elegida del grupo de secuencias CDR que tienen al menos 80%,

preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR correspondientes listadas en la Tabla I, y/o del grupo que consiste de secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con al menos una de las secuencias correspondientes listadas en la Tabla I.

En particular, en los Nanocuerpos de la invención, al menos la secuencia CDR3 es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR3 listadas en la Tabla I, y ya sea la secuencia CDR1 ó la secuencia CDR2 es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR1 y CDR2, respectivamente, listadas en la Tabla I. Preferiblemente, en esta modalidad, la secuencia CDR restante presente es adecuadamente elegida del grupo de secuencias CDR que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias CDR correspondientes listadas en la Tabla I, y/o del grupo que consiste de secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con las secuencias CDR correspondientes listadas en la Tabla I.

Aún más preferiblemente, en los Nanocuerpos de la invención, las tres secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes

son adecuadamente elegidas del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I.

También, en general, las combinaciones de CDR listadas en la Tabla I (es decir, aquellas mencionadas en la misma línea en la Tabla I) son preferidas. De este modo, se prefiere en general que, cuando una CDR en un Nanocuerpo de la invención es una secuencia CDR mencionada en la Tabla I ó es adecuadamente elegida del grupo de secuencias CDR que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia CDR listada en la Tabla I, y/o del grupo que consiste de secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con una secuencia CDR listada en la Tabla I, que al menos una y preferiblemente ambas de las otras CDRs son adecuadamente elegidas de las secuencias CDR que pertenecen a la misma combinación en la Tabla I (es decir, mencionadas en la misma línea en la Tabla I) ó son adecuadamente elegidas del grupo de secuencias CDR que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias CDR que pertenecen a la misma combinación y/o del grupo que consiste de secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1

diferencia(s) de aminoácido(s) con la(s) secuencia(s) CDR que pertenecen a la misma combinación. Las otras preferencias indicadas en los párrafos anteriores también aplican a las combinaciones de CDR mencionadas en la Tabla I.

De este modo, por medio de ejemplos no limitantes, un Nanocuerpo de la invención puede por ejemplo, comprender una secuencias CDR1 que tiene más de 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias CDR1 mencionadas en la Tabla I, una secuencia CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con una de las secuencias CDR2 mencionadas en la Tabla I (pero que pertenecen a una combinación diferente), y una secuencia CDR3.

Algunos Nanocuerpos preferidos de la invención pueden, por ejemplo, comprender: (1) una secuencia CDR1 que tiene más de 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias CDR1 mencionadas en la Tabla I; una secuencia CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácido con una de las secuencias CDR2 mencionadas en la Tabla I (pero que pertenecen a una combinación diferente); y una secuencia CDR3 que tiene más de 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias CDR3 mencionadas en la Tabla I (pero que pertenecen a una combinación diferente); ó (2) una secuencia CDR1 que tiene

más de 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias CDR1 mencionadas en la Tabla I; una secuencia CDR2, y una de las secuencias CDR3 listadas en la Tabla I; ó (3) una secuencia CDR1; una secuencia CDR2 que tiene más de 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias CDR2 listadas en la Tabla I; y una secuencia CDR3 que tiene 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácidos con la secuencia CDR3 mencionada en la Tabla I que pertenece a la misma combinación como la secuencia CDR2.

Algunos Nanocuerpos particularmente preferidos de la invención pueden por ejemplo, comprender: (1) una secuencia CDR1 que tiene más de 80 % de identidad de secuencia con una de las secuencias CDR1 mencionadas en la Tabla I; una secuencia CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácido con la secuencia CDR2 mencionada en la Tabla I que pertenece a la misma combinación; y una secuencia CDR3 que tiene más de 80 % de identidad de secuencia con la secuencia CDR3 mencionada en la Tabla I que pertenece a la misma combinación; (2) una secuencia CDR1; una CDR2 listada en la Tabla I y una secuencia CDR3 listada en la Tabla I (en las cuales la secuencia CDR2 y La secuencia CDR3 pueden pertenecer a combinaciones diferentes).

Algunos Nanocuerpos aún más preferidos de la invención pueden por ejemplo, comprender: (1) una secuencia CDR1 que tiene más de 80 % de identidad de secuencia con

una de las secuencias CDR1 mencionadas en la Tabla I; la secuencia CDR2 listada en la Tabla I que pertenece a la misma combinación; y una secuencia CDR3 mencionada en la Tabla I que pertenece a una combinación diferente; ó (2) una secuencia CDR1 mencionada en la Tabla I; una secuencia CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácidos con la secuencia CDR2 mencionada en la Tabla I que pertenece a la misma combinación; y más de 80% de identidad de secuencia con la secuencia CDR3 listada en la Tabla I que pertenece a la misma combinación.

Los Nanocuerpos particularmente preferidos de la invención pueden por ejemplo, comprender una secuencia CDR1 mencionada en la Tabla I, una secuencia CDR2 que tiene más de 80 % de identidad de secuencia con la secuencia CDR2 mencionada en la Tabla I que pertenece a la misma combinación; y la secuencia CDR3 mencionada en la Tabla I que pertenece a la misma.

En lo más preferido en los Nanocuerpos de la invención, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes son adecuadamente elegidas de una de las combinaciones de secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, listadas en la Tabla I.

Preferiblemente, cuando una secuencia CDR es adecuadamente elegida del grupo de secuencias CDR que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más

preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias CDR listadas en la Tabla I; y/o cuando una secuencia CDR es adecuadamente elegida del grupo que consiste de secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con una de las secuencias CDR listadas en la Tabla I:

i) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa (como se define en este documento); y/o

ii) dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparadas con las secuencias CDR listadas en la Tabla I.

De conformidad con una modalidad no limitante pero preferida de la invención, las secuencias de CDR en los Nanocuerpos de la invención son como se definen anteriormente y también son tales que el Nanocuerpo de la invención se enlaza a TNF-alfa con una constante de disociación (K_D) de 10-5 hasta 10^{-12} moles/litro (M) o menos, y preferiblemente, 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro (M) o menos y más preferiblemente, 10^{-8} hasta 10^{-12} moles/litro (M), y/o una constante de disociación (K_A) de al menos 10^7 M^{-1}, preferiblemente al menos 10^8 M^{-1}, más preferiblemente al menos 10^9 M^{-1}, tal como al menos 10^{12} M^{-1}; y en particular,

99

con una K_D menos de 500 nM, preferiblemente, menos de 200 nM, más preferiblemente, menos de 10 nM, tal como menos de 500 nM. Los valores K_D y K_A del Nanocuerpo de la invención contra TNF-alfa, pueden ser determinados en una manera conocida per se, por ejemplo, usando el ensayo descrito en este documento.

De conformidad con otra modalidad preferida, pero no limitante de la invención, (a) CDR1 tiene una longitud de entre 1 y 12 residuos de aminoácido, y usualmente entre 2 y 9 residuos de aminoácidos, tales como 5, 6 ó 7 residuos de aminoácidos; y/o (b) CDR2 tiene una longitud de entre 13 y 24 residuos de aminoácido, y usualmente entre 15 y 21 residuos de aminoácido, tal como 16 y 17 residuos de aminoácido; y/o (c) CDR3 tiene una longitud de entre 2 y 35 residuos de aminoácido, y usualmente entre 3 y 30 residuos de aminoácido, tales como entre 6 y 23 residuos de aminoácido.

En un aspecto, la invención proporciona Nanocuerpos contra TNF-alfa que son de mejor desempeño que el Nanocuerpo 3E, el mejor desempeño del Nanocuerpo de conformidad con el documento WO 04/041862.

Más específicamente, algunos aspectos preferidos de esta modalidad de la invención son:

XXI) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4

respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), la cual tiene una relación Koff de TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor que 1.10-3 (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

XXII) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4 respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), la cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

XXIII) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 12nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

XXIV) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

XXV) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo; con algunos aspectos particularmente preferidos siendo:

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual es un Nanocuerpo clase GLEW.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual es un Nanocuerpo humanizado.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual contiene un residuo leucina (L) en la posición 108.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos. 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) ó 96 (TNF30).

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

103

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales:

  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; ó

  - CDR2 comprende la secuencia de aminoácido

EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; ó

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y en las cuales:

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y en las cuales

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; ó
  - CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales
  - cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido

conservativa; y/o

- dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.

y con algunos otros aspectos particularmente preferidos siendo:

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual es un Nanocuerpo clase KERE.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos. 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) ó 98 (TNF33).
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido

NYYMG; o una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido NYYMG;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; ó
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales:
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; ó
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; ó
  - CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; CDR2 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido ILPLSDDPGWNTY.

110.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido NYYMG;

y

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG;

y

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; ó
  - CDR2 es la secuencia de aminoácido

NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; CDR2 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácido ILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), en los cuales cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
- dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.
- Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), el cual es un Nanocuerpo humanizado, y con algunos otros aspectos particularmente preferidos siendo:

XXVI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de al menos un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV).

XXVII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV).

XXVIII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

XXIX) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.

XXX) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), ligados vía un enlazador adecuado.

XXXI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), ligados vía un enlazador adecuado, y el cual es pegilado.

XXXII) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual además, comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

XXXIII) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos

Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual además, comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

XXXIV) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual además, comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.

XXXV) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual además, comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales cada uno de los dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV) es ligado, opcionalmente vía un enlazador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

XXXVI) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos

Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual además, comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales cada uno de los dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV) es ligado, opcionalmente vía un enlazador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

XXXVII) Una proteína o polipéptido el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y el cual además, comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales cada uno de los dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV) es ligado, opcionalmente vía un enlazador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con

cualquiera de XXVI) hasta XXXVII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es un Nanocuerpo humanizado.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XXVI) hasta XXXVII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XXVI) hasta XXXVII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es uno elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102) ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XXVI) hasta XXXVII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XXVI) hasta XXXVII), el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos humanizados de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV), y una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID

NO: 63).

Se debe notar que cuando un Nanocuerpo es mencionado anteriormente por estar "de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV) anteriores", está al menos de conformidad con uno de XXI) hasta XXV), puede estar de conformidad con dos o más de XXI) hasta XXV), y puede también incluir uno o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con cualquiera de XXI) hasta XXV) anteriores. De manera similar, cuando una proteína o polipéptido es mencionado anteriormente por estar "de conformidad con cualquiera de XXVI) hasta XXXVII) anteriores", está al menos de conformidad con uno de XXVI) hasta XXXVII), puede estar de conformidad con dos o más de XXVI) hasta XXXVII), y puede también incluir uno o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con cualquiera de XXVI) hasta XXXVII) anteriores.

Un clon que se ha encontrado por ser particularmente útil como un Nanocuerpo anti-TNF, es el clon PMP1C2 (TNF1). Como se puede ver a partir de los datos comparativos del ensayo KYM en la Tabla 39, el TNF1 tiene un valor EC_{50} que es más de 4 veces mejor que el mejor Nanocuerpo monovalente descrito en el documento WO 04/41862 (Nanocuerpo 3E), es decir, 2,466 nM para PMP 1C2 contra 12 nM para 3E (como se puede ver de la Tabla 39, todos los

Nanocuerpos TNF1 a TNF 9 de la invención, dan un mejor valor EC50 en este ensayo que en 3E). En este sentido, se debe notar que el Nanocuerpo 3E del documento WO 04/41862, pertenece a la "clase KERE" (como se describe en este documento), y puede por lo tanto, ser humanizado a un grado menor que el Nanocuerpo PMP1C2 (el cual pertenece a la "clase GLEW"). Cuando el Nanocuerpo PMP1C2 es comparado con el Nanocuerpo IA del documento WO 04/41862, un Nanocuerpo clase GLEW con el grado más alto en homología de secuencia con PMP 1C2 (en tanto las CDR como las estructuras), el valor EC_{50} obtenido para PMP1C2 en el ensayo KYM, es más de 50 veces mejor, es decir, 2.466 nM para PMP1C2, comparado con 100 nM para IA.

Por consiguiente, Nanocuerpos que comprenden uno o más, preferiblemente cualquiera dos y más, preferiblemente tres de las CDR presentes en el clon de PMP1C2 (o secuencias CDR que son derivadas a partir de estas o correspondientes a estas), son particularmente preferidas en la invención. También, estos Nanocuerpos preferiblemente pertenecen al "grupo 103 P,R,S" (como se define en este documento), y más preferiblemente tienen una R en la posición 103, y preferiblemente también tienen una GLEW o secuencia similar a GLEW en las posiciones 44-47. También, cuando estos Nanocuerpos pertenecen al "grupo 103 P, R, S" (y en particular, cuando tienen una R en la

posición 103), una substitución humanizante preferida pero no limitante es 108Q hasta 108L. Otras sustituciones humanizantes preferidas pero no limitantes en estos Nanocuerpos preferidos, son una o más de aquellas presentes en las variantes humanizadas de TNF1 descrito en este documento, tales como TNF13, TNF14, TNF 29 ó TNF30, como será inmediatamente claro a partir de una comparación entre la secuencia de NTF1 y/o estas secuencias humanizadas.

De este modo, en un Nanocuerpo particularmente preferido de la invención, al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presente, es adecuadamente elegida del grupo que consiste de las secuencias CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de "identidad de secuencia" (como se define en este documento) con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido(s)" (como se define en este

documento) con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente.

Preferiblemente, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, al menos dos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes son adecuadamente elegidas del grupo que consiste de la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo que consiste de secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido(s)" con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente.

Más preferiblemente, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, las tres secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes son adecuadamente elegidas del grupo que

consiste de la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente.

Aún más preferiblemente, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes es adecuadamente elegida del grupo que consiste de la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias CDR presentes en el clon TNF1). Preferiblemente, en esta modalidad, al menos una o preferiblemente ambas de las otras dos secuencias CDR presentes, son adecuadamente

elegidas de las secuencias CDR que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de SEC ID NO: 300, respectivamente; y/o adecuadamente elegidas del grupo que consiste de las secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente.

Aún más preferiblemente, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, al menos dos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes son adecuadamente elegidas del grupo que consiste de la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias CDR presentes en el clon TNF1). Preferiblemente, en esta modalidad, la secuencia CDR restante presente es adecuadamente elegida del grupo de secuencias CDR que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300,

respectivamente; y/o del grupo que consiste de secuencias CDR que tienen 3, 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente.

Nanocuerpos particularmente preferidos de la invención, comprenden la secuencia CDR1 de la SEC ID NO: 164, la secuencia CDR2 de la SEC ID NO: 232, y la secuencia CDR3 de la SEC ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias CDR presentes en el clon TNF1).

Nanocuerpos con las secuencias CDR anteriores, preferiblemente tienen secuencias de estructura que son como se definen adicionalmente en este documento. Algunas combinaciones particularmente preferidas, pero no limitantes de las secuencias de estructura, se pueden ver en las Tablas I anteriores. Como será claro para la persona experta, una combinación de secuencias FR1, FR2, FR3 y FR4 que ocurre en el mismo clon (es decir, secuencias FR1, FR2, FR3 y FR4 las cuales son mencionadas en la misma línea en la Tabla I), usualmente serán preferidas (aunque la invención en su sentido más amplio no está limitada a esta, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias de estructura mencionadas en la Tabla I).

Más específicamente, algunos aspectos preferidos de esta modalidad de la invención son:

XXXVIII) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4 respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), en las cuales:

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; ó

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de

aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), en los cuales CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), en los cuales CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), en los cuales:

- CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; ó
- CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII) en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), en los cuales,
  - cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
  - dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual es un Nanocuerpo clase GLEW.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos. 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) ó 96 (TNF30).
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual es un Nanocuerpo humanizado.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual contiene un residuo leucina (L) en la posición 108.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual tiene una relación Koff para TNF mejor que 2.10-3 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor que 1.10-3 (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo;
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

XXXIX) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4 respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), en las cuales

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY;

129

y en las cuales:

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y en las cuales

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), en los cuales

CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), en los cuales: CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN; o
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; ó
  - CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), en los cuales:
  - cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
  - dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada

con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual es un Nanocuerpo clase GLEW.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos. 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) ó 96 (TNF30).
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual es un Nanocuerpo humanizado.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual contiene un residuo leucina (L) en la posición 108.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor que 1.10-3 (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50

del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual es elegido del grupo que consiste de TNF 13 (SEC ID NO: 76), TNF 14 (SEC ID NO: 77), TNF 29 (SEC ID NO: 95) y TNF 30 (SEC ID NO:96).
- Un Nanocuerpo de conformidad con XXXIX), el cual es TNF 30 (SEC ID NO: 96); con algunos otros aspectos siendo:

XL) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX).

XLI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de al menos un Nanocuerpo de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), los cuales son directamente ligados entre sí ó enlazados entre sí vía un enlazador.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos

Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), los cuales son ligados entre sí vía una secuencia de aminoácido.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), los cuales son ligados entre sí vía una secuencia de aminoácido (tal como, sin limitación, una secuencia de aminoácido que comprende residuos de glicina y serina), que comprende al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente al menos 17 aminoácidos, tal como aproximadamente 20-40 aminoácidos (tal como el enlazador GS30).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 7 (SEC ID NO: 73), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF 1 han sido humanizados.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 55 (SEC ID NO: 419) ó TNF 56 (SEC ID NO: 420).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual es pegilado.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con

cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor; y/o el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF, y en el cual la proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), y en el cual la proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales los dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) o XXXIX) están ligados entre sí vía al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y en los cuales los dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX) están ya sea ligados directamente con al menos un Nanocuerpo

dirigido contra albúmina de suero humana, ó están ligados con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana vía un enlazador.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), y en el cual la proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en el cual los dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX) están ligados entre sí vía al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y en los cuales los dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX) están ya sea ligados directamente con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, ó están ligados con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana vía un enlazador, en los cuales el enlazador es una secuencia de aminoácido (tal como, sin limitación, un enlazador que comprende residuos de glicina y serina), y en particular una secuencia de aminoácido que comprende entre 3 y 40 residuos de aminoácidos, tal como entre 5 y 15 residuos de aminoácidos (tal como el enlazador GS9).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende dos

Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX), y en el cual la proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, en los cuales los dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX) están ligados entre sí vía al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, y en los cuales los dos Nanocuerpos de conformidad con XXXVIII) ó XXXIX) están ya sea ligados directamente con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, ó están ligados con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana vía un enlazador, y en los cuales la proteína o polipéptido es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor; y/o en los cuales la proteína o polipéptido es de manera tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es

un Nanocuerpos humanizado.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es uno elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102) ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos humanizados de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI) y una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con

cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF24 (SEC ID NO: 90), en los cuales tanto el Nanocuerpo TNF1, así como también el Nanocuerpo ALB 1, han sido humanizados.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos TNF 30 y un Nanocuerpo ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI), el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 60 (SEC ID NO: 417).

Se debe notar que cuando un Nanocuerpo es mencionado anteriormente por estar "de conformidad con XXXVIII" o "de conformidad con XXXIX", está al menos de conformidad con uno de XXXVIII) y/o XXXIX), y puede también incluir uno o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con XXXVIII" o "de conformidad con XXXIX" anteriores. De manera similar, cuando una proteína o polipéptido es mencionado anteriormente por estar "de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI)", está al menos de conformidad con uno de XL) hasta XLI), puede estar de conformidad con dos o más de VI) hasta XVIII), y puede también incluye cualquiera o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con cualquiera de XL) ó XLI) anteriores.

Para los Nanocuerpos basados en el Nanocuerpos TNF1 anterior (que incluye pero no se limita a los Nanocuerpos humanizados), las secuencias de estructura pueden en general, ser como se describen en este documento, y preferiblemente, son como siguen:

a) FR1 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 130; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 130; o
- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 130;

y

b) FR2 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 198; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 198; o una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido de la SEC

ID NO: 198;

y

c) FR3 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 266; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 266; o
- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 266.

y

d) FR4 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 334; ó
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 334; o
- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 334;

en las cuales las diferencias de aminoácidos presentes en las secuencias de estructura son más preferiblemente,

como se describe en este documento.

Los Nanocuerpos contra TNF, los cuales tienen regiones de estructura como se describe anteriormente (es decir, similar a TNF1), y en los cuales al menos una de las regiones de estructura (tal como alguna de dos, alguna de tres o las cuatro regiones de estructura) han sido humanizadas, forman un aspecto adicional de la invención. Tales Nanocuerpos pueden en particular, tener CDR que son tales que el Nanocuerpo tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor que 1.10-3 (1/s); y/o tienen CDR que son de manera tal que el Nanocuerpo tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; y en particular mejor que 12nM, más en particular mejor que 5 nM, aún más en particular mejor que 3nM. También, ó alternativamente, tales Nanocuerpos son preferiblemente dirigidos contra el mismo epítope de TNF (es decir, el trímero de TNF) como TNF1.

En particular, la invención se refiere a un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual es una variante humanizada de un Nanocuerpo contra TNF-alfa, en el cual, el Nanocuerpo contra TNF-alfa tiene las siguientes

secuencias de estructura: FR1: SEC ID NO: 130; FR2: SEC ID NO: 198; FR3: SEC ID NO: 266; y FR4: SEC ID NO: 334. Tal nanocuerpo puede en particular, tener CDR que son de manera tal que el Nanocuerpo tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor que 1.10-3 (1/s); y/o tiene CDR que son de manera tal que el Nanocuerpo tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; y en particular mejor que 12nM, más en particular mejor que 5 nM, aún más en particular mejor que 3nM. También, ó alternativamente, tales Nanocuerpos son preferiblemente dirigidos contra el mismo epítope de TNF (es decir, el trímero de TNF) como TNF1.

Otro clon que ha sido encontrado por ser particularmente útil como un Nanocuerpo anti-TNF es el clon PMP5F10 (TNF3, SEC ID NO: 60). Como se puede ver a partir de los datos comparativos del ensayo KYM en la Tabla 39, el TNF3 tiene un valor EC50 que es más de 15 veces mejor que el mejor Nanocuerpo monovalente descrito en el documento WO 04/41862.

Por consiguiente, los Nanocuerpos que comprenden uno o más, preferiblemente cualquiera dos y más

preferiblemente las tres CDR presentes en el clon PMP5F10 (o secuencias CDR que son derivadas a partir de estas o corresponden a estas) son particularmente preferidas en la invención. También, estos Nanocuerpos preferiblemente pertenecen a la clase KERE.

Más específicamente, algunos aspectos preferidos de esta modalidad de la invención son:

XLII) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4 respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), en los cuales

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NYYMG; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido NYYMG;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; ó

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), en los cuales CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), en los cuales

CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), en los cuales:
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - CDR2 comprende la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), en los cuales CDR1 comprende la secuencia de aminoácido NYYMG; CDR2 comprende la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido ILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), en los cuales
  - cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
  - dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), el cual es un Nanocuerpo clase KERE.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), el cual tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos. 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) ó 99 (TNF33).
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), el cual es un Nanocuerpo humanizado.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), el cual tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10^{-3} (1/s), preferiblemente mejor que 1.10^{-3} (1/s), ó una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo, o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del

documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM, ó una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula, usando células KYM descritas in Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM, ó una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

XLIII) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4 respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), en las cuales

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácido NYYMG, o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NYYMG, ó una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido NYYMG,

y

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG, o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%,

preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG, ó

- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG, y

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), en los cuales CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), en los cuales CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), en los cuales:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR3 es

la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY; o

- CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; ó

- CDR2 es la secuencia de aminoácido NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), en los cuales CDR1 es la secuencia de aminoácido NYYMG; CDR2 es la secuencia de aminoácido SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácido ILPLSDDPGWNTY.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), en los cuales

- cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o

- dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácidos, y no supresiones o inserciones de aminoácidos, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) anteriores.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual es un Nanocuerpo clase KERE.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de

151

aminoácido de las SEC ID Nos. 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) ó 99 (TNF33).

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual es un Nanocuerpo humanizado.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10^{-3} (1/s), preferiblemente mejor que 2.10^{-3} (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

- Un Nanocuerpo de conformidad con XLIII), el cual es elegido del grupo que consiste de las SEC ID Nos., 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) ó 98 (TNF33) TNF 13 (SEC ID NO: 76), TNF 14 (SEC ID NO: 77), TNF 29 (SEC ID NO: 95) y TNF 30 (SEC ID NO:96),

con algunos otros aspectos siendo:

XLIV) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de un Nanocuerpo de conformidad con XLII) ó XLIII).

XLV) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de al menos un Nanocuerpo de conformidad con XLII) ó XLIII).

XLVI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XLII) ó XLIII).

XLVII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XLII) ó XLIII), y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

XLVIII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XLII) ó XLIII), y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al

menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 6 (SEC ID NO: 72) ó TNF 9 (SEC ID NO: 75, en los cuales ambos Nanocuerpos TNF 3 han sido humanizados.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), el cual es pegilado.
- Una proteína o polipéptido, el cual comprende dos Nanocuerpos de conformidad con XLII) ó XLIII), y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor; y/o el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF, y en el cual la proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), en los cuales al menos

un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es un Nanocuerpo humanizado.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es uno elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102) ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos humanizados de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII) y una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII), el cual comprende ó consiste esencialmente del polipéptido TNF26 (SEC ID NO: 92), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF 3 así como también el Nanocuerpo ALB 1 ha sido humanizado.

Se debe notar que cuando un Nanocuerpo es mencionado anteriormente por estar "de conformidad con XLII" o "de conformidad con XLIII", está al menos de conformidad con uno de XLII) y/o XLIII), y puede también incluir uno o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con XLII)" o "de conformidad con XLIII)" anteriores. De manera similar, cuando una proteína o polipéptido es mencionado anteriormente por estar "de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII)", está al menos de conformidad con uno de XL) hasta XLI), puede estar de conformidad con dos o más de XLIV) hasta XLVIII), y puede también incluir uno o más de los otros aspectos que están indicados por estar "de conformidad con cualquiera de XLIV) ó XLVIII) anteriores.

Para los Nanocuerpos basados en el Nanocuerpo TNF3 anterior (que incluye pero no se limita a los Nanocuerpos humanizados), las secuencias de estructura pueden en general, ser como se describen en este documento, y preferiblemente son como sigue:

a) FR1 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 138; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 138; o
- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 138;

y

b) FR2 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 206; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 206; o
- una secuencia de aminoácido que tiene 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 206;

y

c) FR3 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 274; o
- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al

menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 274; o

- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 274.

y

d) FR4 comprende o es:

- la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 342; o

- una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 342; o

- una secuencia de aminoácido que tiene solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 342;

en las cuales las diferencias de aminoácidos presente en las secuencias de estructura son más preferiblemente como se describen en este documento.

En otro aspecto, la invención se refiere a un Nanocuerpo con una secuencia de aminoácido que es elegida del grupo que consiste de las SEC ID Nos.: 52 hasta 60, del grupo que consiste de las SEC ID Nos.: 76 hasta 86, del grupo que consiste de las SEC ID Nos.: 95 hasta 99, del

grupo que consiste de las SEC ID Nos. 105 hasta 129 o del grupo que consiste a partir de la secuencia de aminoácido que tiene más de 80%, preferiblemente más de 90%, más preferiblemente más de 95%, tal como 99% ó más de "identidad de secuencia" (como se define en este documento) con una ó más de la secuencia de aminoácido de la SEC ID Nos.: 52 hasta 60, SEC ID Nos.: 6 hasta 86, SEC ID Nos.: 95 hasta 99 ó SEC ID Nos. 105 hasta 129, en las cuales, la última secuencia de aminoácido tiene más preferiblemente, secuencias de estructura que son como se definen adicionalmente posteriormente, bajo la descripción general de las secuencias de estructura de Nanocuerpos.

Por consiguiente, en una modalidad específica pero no limitante, las últimas secuencias de aminoácidos son "humanizadas", como se describe además en este documento.

Más preferiblemente, los Nanocuerpos de la invención son elegidos del grupo que consiste de la SEC ID Nos.: 52 hasta 60, del grupo que consiste de las SEC ID Nos.: 76 hasta 86, del grupo que consiste de las SEC ID Nos.: 95 hasta 99, o del grupo que consiste de las SEC ID Nos. 105 hasta 129, de las cuales, los Nanocuerpos "humanizados" de las SEC ID Nos. 76 hasta 86 y SEC ID Nos.: 95 hasta 99 pueden ser particularmente preferidas.

Como se mencionó anteriormente, un Nanocuerpo

particularmente preferido de la invención, es el clon PMP1C2 (TNF1; SEC ID NO: 52). De este modo, en un aspecto preferido, la invención se refiere a un Nanocuerpo con una secuencia de aminoácido que es elegida del grupo que consiste de las SEC ID NO: 52 o del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido que tiene más de 80%, preferiblemente más de 90%, más preferiblemente más de 95%, tal como 99% ó más de "identidad de secuencia" (como se define en este documento) con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 52, en los cuales la última secuencia de aminoácido más preferiblemente tienen secuencias de estructura que son como se definen además posteriormente, bajo la descripción general de las secuencias de estructura de Nanocuerpos.

Particularmente preferidas, son variantes humanizadas del clon PMP1C2 (TNF1; SEC ID NO: 52). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales variantes humanizadas son los clones TNF13 (SEC ID NO: 76), TNF14 (SEC ID NO:77), TNF29 (SEC ID NO: 95) y TNF 30 (SEC ID NO: 96). De este modo, en un aspecto preferido, la invención se refiere a un Nanocuerpo humanizado con una secuencia de aminoácido que es elegida del grupo que consiste de las SEC ID Nos.: 76, 77, 95 ó 96, o del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido que tiene más de 80%, preferiblemente más de 90%, más preferiblemente más de 95%,

tal como 99% ó más de "identidad de secuencia" (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos.: 76, 77, 95 ó 96, en las cuales la última secuencia de aminoácido más preferiblemente tiene secuencias de estructura que son como se definen además posteriormente, bajo la descripción general de las secuencias de estructura de Nanocuerpos.

De conformidad con una modalidad preferida, el Nanocuerpo de la invención es una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 1 (SEC ID NO: 52).

Algunos aspectos preferidos de esta modalidad de la invención son:

XLIX) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF1, el cual tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10^{-3} (1/s), preferiblemente mejor que 1.10^{-3} (1/s).

L) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF1, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo.

LI) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 1, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM.

LII) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 1, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM.

LIII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de al menos un Nanocuerpo el cual es una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 1 de conformidad con cualquiera de XLIX) hasta LII).

LIV) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF1 de conformidad con cualquiera de XLIX) hasta LII) (opcionalmente enlazadas vía un enlazador).

LV) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF1 de conformidad con cualquiera de XLIX) hasta LII) (opcionalmente enlazadas vía un enlazador), y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

LVI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o

consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF1 de conformidad con cualquiera de XLIX) hasta LII) y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.

LVII) Una proteína o polipéptido el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 7 (SEC ID NO: 73), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF1 han sido humanizados.

LVIII) Una proteína o polipéptido el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 7 (SEC ID NO: 73), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF1 han sido humanizados, y el cual es pegilado.

LIX) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF1 de conformidad con cualquiera de XLIX) hasta LII), y el cual además, comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

LX) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF1 de conformidad con cualquiera de XLIX) hasta LII), los cuales son cada uno enlazados (opcionalmente enlazados

vía un enlazador) hasta un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LIII) hasta LX), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es un Nanocuerpo humanizado.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LIII) hasta LX), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LIII) hasta LX), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es uno elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102) ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LIII) hasta LX), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LIII) hasta LX), el cual comprende o

consiste esencialmente del polipéptido TNF24 (SEC ID NO: 90), en los cuales tanto el Nanocuerpo TNF1 así como también el Nanocuerpo ALB TNF1 han sido humanizados.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LIII) hasta LX), el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos TNF 30 y un Nanocuerpo ALB 8.

De conformidad con una modalidad preferida, el Nanocuerpo de la invención es una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 3 (SEC ID NO:60).

Algunos aspectos preferidos de esta modalidad de la invención son:

LXI) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 3, el cual tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor que 1.10-3 (1/s).

LXII) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 3, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo.

LXIII) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 3, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1,

bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5nM.

LXIV) Una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 3, el cual tiene un valor EC50 en el ensayo a base de célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3nM.

LXV) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de al menos un Nanocuerpo el cual es una variante humanizada del Nanocuerpo TNF 3 de conformidad con cualquiera de LXI) hasta LXIV).

LXVI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF 3 de conformidad con cualquiera de LXI) hasta LXIV) (opcionalmente enlazadas vía un enlazador).

LXVII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF 3 de conformidad con cualquiera de LXI) hasta LXIV) (opcionalmente enlazadas vía un enlazador), y el cual es de manera tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la

transducción de señal que es mediada por tal reticulación del receptor.

LXVIII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF 3 de conformidad con cualquiera de LXI) hasta LXIV) y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor TNF en un trímero de TNF.

LXIX) Una proteína o polipéptido el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 6 (SEC ID NO: 72) ó TNF 9 (SEC ID NO: 75), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF 3 han sido humanizados.

LXX) Una proteína o polipéptido el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 6 (SEC ID NO: 72) ó TNF 9 (SEC ID NO: 75), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF 3 han sido humanizados, y el cual es pegilado.

LXXI) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF 3 de conformidad con cualquiera de LXI) hasta LXIV), y el cual además, comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

LXXII) Una proteína o polipéptido, el cual comprende o

consiste esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas del Nanocuerpo TNF 3 de conformidad con cualquiera de LXI) hasta LXIV), las cuales son cada una enlazadas (opcionalmente enlazadas vía un enlazador) hasta un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LXV) hasta LXXII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es un Nanocuerpo humanizado.
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LXV) hasta LXXII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LXV) hasta LXXII), en los cuales al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es uno elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102) ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LXV) hasta LXXII), en los cuales al

menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8.

- Una proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de LXV) hasta LXXII), el cual comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF26 (SEC ID NO: 92), en los cuales tanto los Nanocuerpos TNF 3 así como también el Nanocuerpo ALB 1 han sido humanizados.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende o consiste esencialmente de al menos, un Nanocuerpo contra TNF-alfa como se define en este documento. Tales polipéptidos también son referidos en este documento como "polipéptidos de la invención", y pueden ser como se describe además aquí posteriormente y/o como se describe en general, en el documento WO 04/041862 para los Nanocuerpos descritos aquí, y pueden por ejemplo, ser polipéptidos multivalente o polipéptidos multiespecíficos, nuevamente como se describe además aquí posteriormente.

Preferiblemente, un polipéptido de la invención es ya sea bivalente o trivalente (es decir, que comprende dos o tres Nanocuerpos de la invención, respectivamente, opcionalmente ligados vía uno o dos enlazadores como se define posteriormente, respectivamente), o un polipéptido multiespecífico, que comprende uno o dos, y preferiblemente dos, Nanocuerpos de la invención y al menos, un Nanocuerpo dirigido contra una proteína del suero, y en particular,

contra una proteína del suero humano, tal como contra albúmina de suero humana.

En modalidades preferidas pero no limitantes, los Nanocuerpos de la invención presentes en los polipéptidos de la invención, son elegidos del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 52 a 60 y SEC ID NOs. 105-129 o de las variantes humanizadas de los mismos, y en particular, de los Nanocuerpos "humanizados" de las SEC ID NOS: 76 a 86 y SEC ID NOS:95 a 99. Los Nanocuerpos contra albúmina de suero humana presente en los polipéptidos de la invención, son preferiblemente como se definen posteriormente, y son más preferiblemente elegidas del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 61 a 67, SEC ID NOS: 87 a 89 y SEC ID NOS: 100-104, y en particular, de los Nanocuerpos "humanizados" contra albúmina de suero humano de la SEC ID NOS. 76 a 86 y SEC ID NOS: 100-104.

Con respecto a los Nanocuerpos que están presentes en los polipéptidos de la invención, será claro para la persona experta, que los Nanocuerpos que son mencionados en este documento como "preferidos" (o como "más preferidos", "aún más preferidos", etc.), son también preferidos (o más preferidos, o aún más preferidos, etc.), para uso en los polipéptidos descritos en este documento. De este modo, los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente de uno o más Nanocuerpos "preferidos" de la

invención, en general, serán preferidos, y los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente de uno o más Nanocuerpos "más preferidos" de la invención, en general, serán más preferidos, etc.

De este modo, en la invención, los polipéptidos que comprenden uno o más Nanocuerpos que consisten esencialmente de una de las variantes preferidas del clon PMP1C2 (TNF1; SEC ID NO;52), en el cual dichas variantes preferidas son como se definen en este documento, son particularmente preferidas. Aún más preferido, son polipéptidos que comprenden uno o más Nanocuerpos que esencialmente consisten de las variantes humanizadas del clon PMP1C2 (TNF1; SEC ID NO:52), en el cual, dichas variantes humanizadas son como se definen en este documento (los ejemplos son, sin limitación, TNF13, TNF14, TNF29 y TNF30). El TNF30 es un "bloque de construcción" humanizado particularmente preferido para uso en los polipéptidos de la invención.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales proteínas y polipéptidos son el PMP1C2 mismo, las variantes humanizadas TNF13, TNF14, TN29 y TNF30; los constructos de la SEC ID NO:70 (TNF4), SEC ID NO:73 (TNF7), SEC ID NO:90 (TNF24), SEC ID NO:93 (TNF27); y los constructos de la SEC ID NO:417 (TNF60), SEC ID NO:419 (TNF55) y SEC ID NO:420 (TNF56), en los cuales, los tres

últimos constructos contienen la variante humanizada TNF30 como un bloque de construcción.

Como se mencionó en este documento, los Nanocuerpos y constructos descritos en este documento, pueden ser pegilados, o contener uno o más residuos de aminoácido (adicionales), que permiten la pegilación y/o facilitan la pegilación. Dos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales polipéptidos son, TNF55 y TNF56, los cuales ambos contienen un residuo de cisteína adicional para la unión fácil de un grupo PEG.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de polipéptidos de la invención, son los polipéptidos bivalentes de la invención de las SEC ID NOS: 70 a 75 y los polipéptidos multiespecíficos de la invención de las SEC ID NO:90 hasta 94, y las SEC ID NOS 417 hasta 420.

Como se puede ver a partir de los datos presentados abajo, y en particular de los datos dados en el Ejemplo Comparativo, los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención, tienen propiedades mejoradas. En particular, las proteínas y polipéptidos de la invención pueden tener afinidad mejorada para TNF-alfa humano (expresado como el valor EC_{50} en el ensayo KYM descrito en este documento), comparados con los biológicos anti-TNF comercialmente disponibles Enbrel™, Humira™, y Remicade™. También, los Nanocuerpos descritos en este documento, pueden tener una

afinidad mejorada para TNF-alfa comparada con el mejor desempeño del Nanocuerpo descrito en la solicitud Internacional WO 04/041862. Puede esperarse además, que los polipéptidos de la invención que comprenden al menos, uno de los Nanocuerpos de la invención, también tendrán propiedades mejoradas comparadas con los polipéptidos que comprenden solamente los Nanocuerpos contra TNF-alfa descritos en el documento WO 04/041862.

Más en particular, un polipéptido como se describe en este documento, que comprenden dos o más (y preferiblemente dos) Nanocuerpos como en este documento (y opcionalmente por ejemplo, un Nanocuerpo contra albúmina de suero humana), que tiene un valor EC50 en el ensayo a base de la célula usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 de Humira® en Remicade®, y preferiblemente, también mejor que Enbrel® en el mismo ensayo.

Por ejemplo, tal proteína o polipéptido, preferiblemente tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3) del documento WO 04/041862 que es mejor de 0.2 nM, preferiblemente, mejor que 0.1 nM, tal como mejor que 0.7 nM y en particular, mejor que 0.4 nM.

También se ha mostrado por los solicitantes, que los Nanocuerpos contra TNF-alfa de ratón y polipéptidos que

comprenden Nanocuerpos contra TNF-alfa de ratón, muestran una actividad biológica benéfica en los siguientes modelos de enfermedad (datos no mostrados):

- El modelo de dextran sulfato de sodio ("DSS") de colitis, usando tanto ratones regulares como también ratones agénicos IL-10, como se describe por Okayasu et al. (Gastroenterol 1990, 98(3): 694).
- El modelo de artritis inducida por colágeno ("CIA") de artritis ("RA"), como se describe por Courtenay et al. (Nature 1980, 283(5748): 666), usando tanto ratones regulares como también ratones agénicos IL-10;
- El modelo de ratón agénico IL-10 de IBD, como por ejemplo, se describe por Rennick et al. (Clin Immunol Immunopathol 1995, 76(3 Pt 2): S174).
- El modelo Kollias de RA como por se describe por ejemplo, por Keffer et al. (EMBO J 1991, 10(13): 4025).
- El modelo de ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico ("TNBS") de IBD, como se describe por Elson *et al.*, (J Immunol 1996, 157(5): 2174).
- El modelo CIA de RA, descrito por Koppieters et al (manuscrito en preparación);
- El modelo de fibroblasto derivado del sinovial (descrito posteriormente); y
- El modelo de bolsa de aire murino.

Preferiblemente, los Nanocuerpos descritos en este documento, son mejores que el Nanocuerpo 1A a partir del documento WO 04/041862 en al menos, uno de estos modelos, y preferiblemente en todos estos modelos; y más preferiblemente son mejores que el Nanocuerpo 3E del documento WO 04/041862 en al menos uno de estos modelos, y preferiblemente, en todos estos modelos. También, los polipéptidos descritos en este documento, son preferiblemente equivalentes a, o mejores que Humira® o Remicade® en al menos, uno de estos modelos, y preferiblemente, en todos estos modelos; y más preferiblemente, también equivalentes a, o mejores que Enbrel® en al menos, uno de estos modelos, y preferiblemente en todos estos modelos.

Estos datos confirman que los Nanocuerpos contra TNF-alfa y polipéptidos que contienen a los mismos, tales como los Nanocuerpos y polipéptidos descritos en el documento WO 04/041862 y en particular, los Nanocuerpos y polipéptidos descritos en este documento, deben tener eficacia terapéutica contra enfermedades y trastornos mediados por TNF, tal como las enfermedades y trastornos mencionados anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un Nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención. Tal ácido nucleico

también se referirá abajo como un "ácido nucleico de la invención", y puede por ejemplo, estar en la forma de un constructo genético, como se define posteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un hospedero o célula hospedera que expresa o es capaz de expresar un Nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención; y/o que contiene un ácido nucleico que codifica un Nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención. Tal hospedero o célula hospedera, puede también ser análoga al hospedero o células hospederas descritas en el documento WO 04/041862, pero que expresan o son capaz de expresar un Nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención y/o que contiene un ácido nucleico como se describe en este documento.

La invención además se refiere a un producto o composición que contiene o comprende un Nanocuerpo de la invención, un polipéptido de la invención; y/o un ácido nucleico de la invención. Tal producto o composición puede por ejemplo, ser una composición farmacéutica (como se describe abajo), o un producto o composición para uso de diagnóstico (como también se describe abajo). Tal producto o composición puede también ser análoga a los productos y composiciones descritas en el documento WO 04/041862, pero que contienen o comprenden un Nanocuerpo de la invención, un polipéptido de la invención o un ácido nucleico de la invención.

La invención además se refiere a métodos para preparar o generar los Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células hospederas, productos y composiciones como se describe en este documento, en el cual, los métodos son como se describen además posteriormente. También, en general, los Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células hospederas, productos y composiciones descritas en este documento, también pueden ser preparados y usados en una manera análoga a la manera descrita en el documento WO 04/041862.

La invención además se refiere a aplicaciones y usos de los Nanocuerpos anteriores, polipéptidos, ácidos nucleicos, células hospederas, productos y composiciones descritas en este documento, en la cual las aplicaciones y usos incluyen, pero no se limitan a, las aplicaciones y usos descritos aquí posteriormente y/o los usos adicionales y aplicaciones para Nanocuerpos contra TNF-alfa y/o para polipéptidos que contienen los mismos en el documento WO 04/041862.

Otros aspectos, modalidades, ventajas y solicitudes de la invención, llegarán a ser claros a partir de la descripción adicional aquí posteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los aspectos anteriores y otros y modalidades de

la invención, llegarán a ser más claros a partir de la descripción adicional aquí posteriormente, en la cual:

a) A menos que se indique o se defina de otro modo, todos los términos usados tienen su significado usual en la técnica, la cual será clara para la persona experta. La referencia es por ejemplo, hecha a los manuales estándares, tales como, Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2da.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2da. edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10th Ed Blackwell Publishing, UK (2001), y Janeway et al, "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), así como también, a la técnica antecedente general mencionada en este documento;

b) A menos que se indique de otro modo, el término "secuencia de inmunoglobulina" - si se usa en este documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un

177.

anticuerpo de 4 cadenas convencional- se usa como un término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales de los mismos, así como también todas las partes, dominios o fragmentos de los mismos (que incluyen, pero no se limitan a, dominios o fragmentos de enlace al antígeno, tales como dominios V_{HH} o dominios V_H/V_L, respectivamente. Además, el término "secuencia" como se usa en este documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia V_{HH}" o "secuencia de proteína"), deben ser en general, entendidos por incluir tanto la secuencia de aminoácido relevante, así como también secuencias de ácido nucleico o secuencias de nucleótido que codifican a los mismos, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

c) A menos que se indique de otro modo, todos los motos, etapas, técnicas y manipulaciones que no son específicamente descritas en detalle, pueden ser realizado y han sido realizados en una manera conocida per se, como será claro para las personas expertas. La referencia es hecha nuevamente, por ejemplo, a los manuales estándares, a la técnica de antecedente general referida anteriormente y a las referencias adicionales citadas en este documento;

d) Los residuos de aminoácido serán indicados de conformidad con el código de aminoácido de una letra o

tres letras, como se menciona en la Tabla 1;

Tabla 1: Código de aminoácido de una letra y tres letras

No polar, no cargado (a pH 6.0 – 7.0)[3]	Alanina	Ala	A
	Valina	Val	V
	Leucina	Leu	L
	Isoleucina	Ile	I
	Fenilalanina	Phe	F
	Metionina[1]	Met	M
	Triptofano	Trp	W
	Prolina	Pro	P
Polar, no cargado (a pH 6.0-7.0)	Glicina[2]	Gly	G
	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Cisteína	Cys	C
	Asparagina	Asn	N
	Glutamina	Gln	Q
	Tirosina	Tyr	Y
Polar, cargado (a pH 6.0-7.0)	Lisina	Lys	K
	Arginina	Arg	R
	Histidina[4]	His	H
	Aspartato	Asp	D
	Glutamato	Glu	E

Notas:

(1) Algunas veces también considerado por ser un aminoácido polar, no cargado.

(2) Algunas veces también considerado por ser un aminoácido no polar, no cargado.

(3) Como será claro para las personas expertas, el hecho de que un residuo de aminoácido es referido en esta Tabla por ser ya sea cargado o no cargado a pH 6.0 hasta 7.0, no se refleja en alguna forma, en la carga que dicho residuo de aminoácido puede tener a un pH inferior que 6.0 y/o a un pH superior que 7.0; los residuos de aminoácido mencionados en la Tabla 5, pueden ser ya sea cargados y/o no cargados, a tal pH superior o inferior, como será claro para las personas expertas.

(4) Como se sabe en la técnica, la carga de un residuo His es mayormente dependiente de aún cambios menores en pH, pero un residuo His puede en general, ser considerado esencialmente no cargado a un pH de aproximadamente 6.5.

e) Para propósitos de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de nucleótido y una segunda secuencia de nucleótido, puede ser calculada dividiendo [el número de nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótido] por [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótido], y multiplicando por [100%], en tal caso, supresión, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótido -comparada con la primera secuencia de nucleótido-, es considerado como una diferencia en un nucleótido único (posición).

Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos puede ser calculado usando un algoritmo de ordenador conocido para alineación de secuencia, tal como NCBI Blast v2.0, usando ajustes estándares.

Algunas otras técnicas, algoritmos de ordenador y ajustes para determinar el grado de identidad de secuencia son por ejemplo, descritos en los documentos WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 y GB 2 357 768-A.

Usualmente, para propósitos de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias de nucleótido de conformidad con el método de cálculo resumido aquí anteriormente, la secuencia de nucleótido con el número más grande de nucleótidos, se tomará como la "primera" secuencia de nucleótidos, y la otra secuencia de nucleótidos será tomada como la "segunda" secuencia de nucleótidos.

f) Para propósitos de comparación de dos o más secuencias de aminoácido, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de aminoácido y una secuencia de aminoácido, puede ser calculado dividiendo [el número de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácido, que son idénticos a los residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácido] por [el número total de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácido] y multiplicando por [100%], en los cuales, cada supresión, inserción, substitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácido -comparada con la primera secuencia de aminoácido- es considerada como la diferencia en un residuo de aminoácido único (posición), es decir, como una "diferencia de aminoácido", como se define abajo.

Alternativamente, el grado de identidad de

secuencia entre dos secuencias de aminoácido, puede ser calculado usando un algoritmo de ordenador conocido, tal como aquellos mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad de secuencia para secuencias de nucleótidos, nuevamente usando ajustes estándares.

Usualmente, para propósitos de terminar el porcentaje de "identidad de secuencia", entre dos secuencias de aminoácido de conformidad con el método de cálculo resumido aquí anteriormente, la secuencia de aminoácido con el número más grande de residuos de aminoácido, será tomada como la "primera" secuencia de aminoácido, y la otra secuencia de aminoácido será tomada como la "segunda" secuencia de aminoácido.

También, determinando el grado de identidad de secuencia entre las dos secuencias de aminoácido, la persona experta puede tomar en cuenta las así llamadas sustituciones de aminoácido "conservativas", las cuales pueden en general, ser descritas como sustituciones de aminoácido en las cuales, un residuo de aminoácido es reemplazado con otro residuo de aminoácido de estructura química similar y el cual tiene poca o ninguna influencia en la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones de aminoácido conservativas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, a partir de los documentos WO 04/037999, GB-A-2

357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y tipos (preferidos) y/o combinaciones de tales sustituciones, pueden ser seleccionadas en base a las enseñanzas pertinentes a partir del documento WO 04/037999, así como también el documento WO 98/49185 y a partir de las referencias adicionales citadas en este documento.

Tales sustituciones conservativas preferiblemente son sustituciones en las cuales, un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) es sustituido por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) residuos alifáticos menores, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares, negativamente cargados y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares, positivamente cargados: His, Arg y Lys; (d) residuos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, He, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

Sustituciones conservativas particularmente preferidas son como sigue: Ala en Gly o es Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; His en Asn o en Gln; He en Leu o en Val; Leu en He o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en He; Phe en Met, en Leu o en Tyr; Ser en Thr; Thr en Ser; Trp en Tyr; Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en He o en Leu.

Cualquiera de las sustituciones de aminoácido

aplicadas a los polipéptidos descritos en este documento, pueden también basarse en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrolladas por Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de los potenciales que forman estructura desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13:1211, 1974 y Adv. Enzymol., 47:45-149, 1978, y en los análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrolladas por Eisenberg et al., Proc. Nad. Acad Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 198 1, and Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986, todas incorporadas en este documento en su totalidad por referencia. La información en la estructura primaria, secundaria y terciaria de Nanocuerpos dada en la descripción en este documento y en la técnica de antecedente general citada anteriormente. También, para este propósito, la estructura cristalina de un dominio VHH de una llama es por ejemplo, dado por Desmyter et al., Nature Structural Biology, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; and Decanniere et al., Structure, Vol. 7, 4, 361 (1999). Información adicional acerca de los residuos de aminoácido que en los dominios VH convencionales forman la interfaz de VH/VL y las sustituciones camelizantes potenciales en estas

posiciones, se pueden encontrar en la técnica anterior en los Nanocuerpos citados en este documento;

g) secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos se dice son "exactamente las mismas", si tienen 100% de identidad de secuencia (como se define en este documento), en su longitud completa;

h) cuando se comparan dos secuencias de aminoácido, el término "diferencia de aminoácido", se refiere a una inserción, supresión o sustitución de un residuo de aminoácido único en una posición de la primera secuencia, comparada con la segunda secuencia; se entiende que dos secuencias de aminoácido pueden contener una, dos o más de tales diferencias de aminoácidos;

i) una secuencia de aminoácido o una secuencia de aminoácido es considerada por estar "(en) (forma) esencialmente aislada"-, por ejemplo, comparada con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo a partir del cual se ha obtenido -, cuando se ha separado de al menos, otro componente con el cual está usualmente asociado en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos, un contaminante, impureza o componente menor. En particular, una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácido se considera "esencialmente aislada", cuando se ha purificada en al

menos, 2 veces, en particular, al menos 10 veces, más en particular, al menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácido que está en "forma esencialmente aislada", es preferiblemente esencialmente homogénea, como se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como poliacrilamida-electrofóresis;

j) El término "dominio" como se usa en este documento, se refiere a una región globular de una cadena de anticuerpo, y en particular, a una región globular de un anticuerpo de cadena pesada, o a un polipéptido que consiste esencialmente de tal región globular. Usualmente, tal dominio comprenderá bucles peptídicos (por ejemplo, 3 ó 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, como una lámina o por enlaces disulfuro.

k) El término "determinante antigénica" se refiere al epítope en el antígeno reconocido por la molécula de enlace al antígeno (tal como un Nanocuerpo o un polipéptido de la invención) y más en particular, por el sitio de enlace al antígeno de dicha molécula. Los términos "determinante antigénica" y "epítope" puede también ser usado intercambiablemente en este documento.

l) Una secuencia de aminoácido (tal como un Nanocuerpo, un anticuerpo, un polipéptido de la invención,

o en general una proteína de enlace al antígeno o polipéptido o fragmento del mismo), que pueden enlazarse a, que tiene afinidad para y/o, tiene especificidad para un determinante antigénico específico, epítope, antígeno o proteína (o por al menos, una parte, fragmento, epítope del mismo), se dice es "contra" o "se dirige contra", dicho determinante antigénico, epítope, antígeno o proteína.

m) El término "especificidad", se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicas en las cuales una molécula de enlace al antígeno particular o molécula de proteína de enlace al antígeno se puede enlazar (tal como un Nanocuerpo o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de enlace al antígeno se puede determinar basada en la afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de enlace al antígeno (KD), es una medida para la intensidad de enlace entre una determinante antigénica y un sitio de enlace al antígeno en la proteína de enlace al antígeno: a menor valor de KD, más fuerte la resistencia de enlace entre una determinante antigénica y la molécula de enlace al antígeno (alternativamente, la afinidad puede también ser expresada como la constante de afinidad (KA), la cual es 1/KD). Como será claro para las personas expertas (por ejemplo, en base a la descripción

adicional en este documento), la afinidad puede ser determinada en una manera conocida por se, dependiendo del antígeno específico de interés. La avidez es la medida de la resistencia de enlace entre una molécula de enlace al antígeno (tal como un Nanocuerpo o polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente. La avidez está relacionada con tanto la afinidad entre una determinante antigénica y su sitio de enlace al antígeno en la molécula de enlace al antígeno y el número de sitios de enlace pertinentes presentes en la molécula de enlace al antígeno. Típicamente, las proteínas de enlace al antígeno (tales como los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención), se enlazarán con una constante de disociación (KD) de 10^{-5} hasta 10^{-12} moles/litro (M) o menos, y preferiblemente 10^{-7} hasta 10^{-12} moles/litro (M) o menos y más preferiblemente 10^{-8} hasta 10^{-12} moles/litro, y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos 10^{-7} M^{-1}, preferiblemente, al menos 10^{8} M^{-1}, más preferiblemente al menos 10^{9} M^{-1}, tal como al menos 10^{12} M^{-1}.

Cualquier valor K_D mayor que 10^{-4} M generalmente se considera que indica enlace no específico. Preferiblemente, un Nanocuerpo o polipéptido de la invención enlazará el antígeno deseado con una K_D menor que 500 nM, preferiblemente menos de 200 nM, más preferiblemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 nM.

El enlace específico de una proteína de enlace de antígeno a un determinante antígeno o antigénico se puede determinar en cualquier manera conocida per se, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de enlace competitivos, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos de enzima (EIA) y ensayos de competición intercalada, y las diferentes variantes de los mismos conocidas per se en la técnica.

n) como se describe adicionalmente posteriormente, la secuencia de aminoácido y estructura de un Nanocuerpo se puede considerar - sin embargo sin limitarse a esto - que están comprendidas de cuatro regiones de estructura o "FR's", las cuales son referidas en la técnica y posteriormente como *"región de estructura 1"* o *"FR1"*, como *"región de estructura 2"* o *"FR2"*; como *"región de estructura 3"* o *"FR3"*, y como *"región de estructura 4"* o *"FR4"*, respectivamente; las regiones de estructura son interrumpidas por las regiones determinantes complementarias o "CDR's", las cuales son referidas en la técnica como *"región determinante complementaria 1"* o *"CDR1"*; como *"región determinante complementaria 2"* o *"CDR2"*; y como *"región determinante complementaria 3"* o *"CDR3"*, respectivamente;

o) también como se describe adicionalmente posteriormente, el número total de residuos aminoácido en

un Nanocuerpo puede estar en la región de 110-120, preferiblemente es 112-115, y muy preferiblemente 113. Sin embargo, se deberá señalar que las partes, fragmentos o análogos (como se describe adicionalmente posteriormente) de un Nanocuerpo no se limitan particularmente en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos o análogos cumplan los requerimientos adicionales resumidos posteriormente y también preferiblemente son adecuados para los propósitos descritos en la presente;

p) los residuos aminoácido de un Nanocuerpo son numerados de conformidad con la numeración general para dominios V_H dados por Kabat et al. ("*Sequence of proteins of immunological interest*", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91), como se aplica a dominios V_{HH} de Camélidos en el artículo de Riechmann and Muyldermans, referido como anteriormente (véase, por ejemplo figura 2 de la referencia). De conformidad con esta numeración, la FR1 de un Nanocuerpo comprende los residuos aminoácido en las posiciones 1-30, la CDR1 de un Nanocuerpo comprende los residuos aminoácido en las posiciones 31-36, la FR2 de un Nanocuerpo comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 de un Nanocuerpo comprende los residuos aminoácido en las posiciones 50-65, la FR3 de un Nanocuerpo comprende los residuos aminoácido en las

posiciones 66-94, la CDR3 de un Nanocuerpo comprende los residuos aminoácido en las posiciones 95-102, y la FR4 de un Nanocuerpo comprende los residuos aminoácido en la posiciones 103-113. [A este respecto, se deberá señalar que - como también se conoce en la técnica para dominios V_H y para dominios V_{HH} - el número total de residuos aminoácido en cada una de las CDR's puede variar y puede no corresponder al número total de residuos aminoácido indicados por la numeración Kabat (es decir, una o más posiciones de conformidad con la numeración Kabat pueden no ser ocupadas en la secuencia actual, o la secuencia actual puede contener más residuos aminoácido que el número permitido por la numeración Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración de conformidad con Kabat puede o no puede corresponder con la numeración actual de los residuos aminoácido en la secuencia actual. Generalmente, sin embargo, se puede decir que, de conformidad con la numeración de Kabat y sin consideración del número de residuos aminoácido en las CDR's, la posición 1 de conformidad con la numeración Kabat corresponde al inicio de FR1 y viceversa, la posición 36 de conformidad con la numeración Kabat corresponde al inicio de FR2 y viceversa, la posición 66 de conformidad con la numeración Kabat corresponde al inicio de FR3 y viceversa, y la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat corresponde al

191

inicio de FR4 y viceversa].

Los métodos alternativos para numerar los residuos aminoácido de dominios V_H, los métodos también se pueden aplicar de una manera análoga a los dominios V_{HH} de Camélidos y a Nanocuerpos, son el método descrito por Chothia et al. (*Nature* 342, 877-883 (1989)), la así llamada "*definición AbM*" y la así llamada "*definición de contacto*". Sin embargo, en la presente descripción, reivindicaciones y figuras, la numeración de conformidad con Kabat como se aplica a los dominios V_{HH} de Riechmann and Muyldermans será seguida, a menos que se indique de otra forma; y

q) Las figuras, listado de secuencia y la Parte Experimental/Ejemplos solamente se dan para ilustrar adicionalmente la invención y no se deberá interpretar o construir como limitante del alcance de la invención y/o de las reivindicaciones anexas en alguna forma, a menos que se indique explícitamente de otra forma en la presente.

Para una descripción general de anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables de los mismos, se hace referencia inter alia a las siguientes referencias, las cuales se mencionan como técnica antecedente general: WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; WO

97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics N.V. y solicitante; WO 01/90190 del National Research Council of Canada; WO 03/025020 (= EP 1 433 793) del Institute of Antibodies; así como WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 del solicitante applicant y las solicitudes de patente publicadas adicionales del solicitante; Hamers-Casterman et al., Nature 1993 Junio 3; 363 (6428): 446-8; Davies and Riechmann, FEBS Lett. 1994 Feb 21; 339(3): 285-90; Muyldermans et al., Protein Eng. 1994 Sep; 7(9): 1129-3; Davies and Riechmann, Biotechnology (NY) 1995 Mayo; 13(5): 475-9; Gharoudi et al., 9th Forum of Applied Biotechnology, Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 1995; 60/4a parte I: 2097-2100; Davies and Riechmann, Protein Eng. 1996 Junio; 9(6): 531- 7; Desmyter et al., Nat Struct Biol. 1996 Septiembre; 3(9): 803-11; Sheriff et al., Nat Struct Biol. 1996 Septiembre; 3(9): 733-6; Spinelli et al., Nat Struct Biol. 1996 Septiembre; 3(9): 752-7; Arbabi Ghahroudi et al., FEBS Lett. 1997 Septiembre 15; 414(3): 521-6; Vu et al., Mol Immunol. 1997 Noviembre-Diciembre; 34(16-17): 1121-31; Atarhouch et al., Journal of Camel Practice and Research 1997; 4: 177-182; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 1998 Enero 23; 275(3): 413-8; Lauwereys et al., EMBO J. 1998 Julio 1; 17(13): 3512-20; Frenken et al., Res Immunol.

1998 Julio- Agosto; 149(6):589-99; Transue et al., Proteins 1998 Septiembre 1; 32(4): 515-22; Muyldermans and Lauwereys, J. Mol. Recognit. 1999 Marzo-Abril; 12 (2): 131-40; van der Linden et al., Biochim. Biophys. Acta 1999 Abril 12; 1431(1): 37-46.; Decanniere et al., Structure Fold. Des. 1999 Abril 15; 7(4): 361-70; Ngyuen et al., Mol. Immunol. 1999 Junio; 36(8): 515-24; Woolven et al., Immunogenetics 1999 Octubre; 50 (1-2): 98-101; Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 1999 Diciembre 10; 231 (1-2): 25-38; Spinelli et al., Biochemistry 2000 Febrero 15; 39(6): 1217-22; Frenken et al., J. Biotechnol. 2000 Febrero 28; 78(1): 11-21; Nguyen et al., EMBO J. 2000 Marzo 1; 19(5): 921-30; van der Linden et al., J. Immunol. Methods 2000 Junio 23; 240 (1-2): 185-95; Decanniere et al., J. Mol. Biol. 2000 Junio 30; 300 (1): 83-91; van der Linden et al., J. Biotechnol. 2000 Julio 14; 80(3): 261-70; Harmsen et al., Mol. Immunol. 2000 Agosto; 37(10): 579-90; Perez et al., Biochemistry 2001 Enero 9; 40(1): 74-83; Conrath et al., J. Biol. Chem. 2001 Marzo 9; 276 (10): 7346-50; Muyldermans et al., Trends Biochem Sci. 2001 Abril; 26(4):230-5; Muyldermans S., J. Biotechnol. 2001 Junio; 74 (4): 277-302; Desmyter et al., J. Biol. Chem. 2001 Julio 13; 276 (28): 26285-90; Spinelli et al., J. Mol. Biol. 2001 Agosto 3; 311 (1): 123-9; Conrath et al., Antimicrob Agents Chemother. 2001 Octubre; 45 (10): 2807-

12; Decanniere et al., J. Mol. Biol. 2001 Octubre 26; 313(3): 473-8; Nguyen et al., Adv Immunol. 2001; 79: 261-96; Muruganandam et al., FASEB J. 2002 Febrero; 16 (2): 240-2; Ewert et al., Biochemistry 2002 Marzo 19; 41 (11): 3628-36; Dumoulin et al., Protein Sci. 2002 Marzo; 11 (3): 500-15; Cortez- Retamozo et al., Int. J. Cancer. 2002 Marzo 20; 98 (3): 456-62; Su et al., Mol. Biol. Evol. 2002 Marzo; 19 (3): 205-15; van der Vaart JM., Methods Mol Biol. 2002; 178: 359-66; Vranken et al., Biochemistry 2002 Julio 9; 41 (27): 8570-9; Nguyen et al., Immunogenetics 2002 Abril; 54 (1): 39-47; Renisio et al., Proteins 2002 Junio 1; 47 (4): 546-55; Desmyter et al., J. Biol. Chem. 2002 Junio 28; 277 (26): 23645-50; Ledeboer et al., J. Dairy Sci. 2002 Junio; 85 (6): 1376-82; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2002 Agosto 16; 277 (33): 29897-907; Ferrat et al., Biochem. J. 2002 Septiembre 1; 366 (Pt 2): 415-22; Thomassen et al., Enzyme and Microbial Technol. 2002; 30: 273-8; Harmsen et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002 Diciembre; 60 (4): 449-54; Jobling et al., Nat Biotechnol. 2003 Enero; 21 (1): 77-80; Conrath et al., Dev. Comp. Immunol. 2003 Febrero; 27 (2): 87-103; Pleschberger et al., Bioconjug. Chem. 2003 Marzo-Abril; 14 (2): 440-8; Lah et al., J. Biol. Chem. 2003 Abril 18; 278 (16): 14101-1 1; Nguyen et al., Immunology. 2003 Mayo; 109 (1): 93-101; Joosten et al., Microb. Cell Fact. 2003 Enero 30; 2 (1): 1; Li et al., Proteins 2003

Julio 1; 52 (1): 47-50; Loris et al., Biol Chem. 2003 Julio 25; 278 (30): 28252-7; van Koningsbruggen et al., J. Immunol. Methods. 2003 Agosto; 279 (1-2): 149-61; Dumoulin et al., Nature. 2003 Agosto 14; 424 (6950): 783-8; Bond et al., J. Mol. Biol. 2003 Septiembre 19; 332 (3): 643-55; Yau et al., J. Immunol. Methods. 2003 Octubre 1; 281 (1-2): 161-75; Dekker et al., J. Virol. 2003 Noviembre; 77 (22): 12132-9; Meddeb-Mouelhi et al., Toxicon. 2003 Diciembre; 42 (7): 785-91; Verheesen et al., Biochim. Biophys. Acta 2003 Diciembre 5; 1624 (1-3): 21-8; Zhang et al., J Mol Biol. 2004 Enero 2; 335 (1): 49-56; Stijlemans et al., J Biol Chem. 2004 Enero 9; 279 (2): 1256-61; Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 2004 Abril 15; 64 (8): 2853-7; Spinelli et al., FEBS Lett. 2004 Abril 23; 564 (1-2): 35-40; Pleschberger et al., Bioconjug. Chem. 2004 Mayo-Junio; 15 (3): 664-71; Nicaise et al., Protein Sci. 2004 Julio; 13 (7): 1882-91; Omidfar et al., Tumour Biol. 2004 Julio-Agosto; 25 (4): 179-87; Omidfar et al., Tumour Biol. 2004 Septiembre-Diciembre; 25(5-6): 296-305; Szynol et al., Antimicrob Agents Chemother. 2004 Septiembre; 48(9):3390-5; Saerens et al., J. Biol. Chem. 2004 Diciembre 10; 279 (50): 51965-72; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2004 Diciembre 17; 279 (51): 53593-601; DoUc et al., Appl. Environ. Microbiol. 2005 Enero; 71(1): 442-50; Joosten et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2005 Enero; 66(4): 384-92; Dumoulin

et al., J. Mol. Biol. 2005 Febrero 25; 346 (3): 773-88; Yau et al., J Immunol Methods. 2005 Febrero; 297 (1-2): 213-24; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2005 Abril 8; 280 (14): 14114-21; Huang et al., Eur. J. Hum. Genet. 2005 Abril 13; Dolk et al., Proteins. 2005 Mayo 15; 59 (3): 555-64; Bond et al., J. Mol. Biol. 2005 Mayo 6;348(3):699-709; Zarebski et al., J. Mol. Biol. 2005 Abril 21; [E-publicación antes de impresión].

De conformidad con la terminología usada en las referencias anteriores, los dominios variables presentes en anticuerpos de cadena pesada que se presentan naturalmente también serán referidos como "*dominios* V_{HH}", para distinguirlos de los dominios variables de cadena presada que están presentes en anticuerpos de 4-cadenas convencionales (los cuales serán referidos posteriormente como "*dominios* V_H") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (los cuales serán referidos posteriormente como "*dominios* V_L").

Como se mencionó en la técnica previa referida anteriormente, los dominios V_{HH} tienen un número de características estructurales únicas y propiedades funcionales las cuales hacen a los dominios V_{HH} aislados (así como los Nanocuerpos a base de estos, los cuales comparten estas características estructurales y propiedades

funcionales con los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente) y proteínas que contienen los mismos altamente ventajosos para el uso como proteínas o dominios de enlace de antígeno funcionales. En particular, y sin que se limite a esto, los dominios V_{HH} (los cuales se han "diseñado" por la naturaleza para enlazar funcionalmente un antígeno sin la presencia de, y sin alguna interacción con, un dominio variable de cadena ligera) y los Nanocuerpos pueden funcionar como una unidad, dominio o proteína estructural de enlace de antígeno funcional, relativamente pequeña, única. Esto distingue a los dominios V_{HH} de los dominios V_H y V_L de los anticuerpos de 4 cadenas convencionales, los cuales por si mismo son generalmente no adecuados para la aplicación práctica como proteínas o dominios de enlace de antígeno, sino necesitan ser combinados en alguna forma u otra para proporcionar una unidad de enlace de antígeno funcional (como en por ejemplo fragmentos de anticuerpo convencionales tales como fragmentos Fab; en fragmentos ScFv, los cuales consisten de un dominio V_H covalentemente enlazado a un dominio V_L).

Debido a estas propiedades únicas, el uso de dominios V_{HH} y Nanocuerpos como proteínas de enlace de antígeno únicas o como dominios de enlace de antígeno (es decir, como parte de una proteína o polipéptido mayor) ofrece un número de ventajas significativas sobre el uso de

dominios V_H y V_L convencionales, scFv's o fragmentos de anticuerpo convencionales (tales como fragmentos Fab o $F(ab')_2$):

- solamente un dominio único es requerido para enlazar un antígeno con alta afinidad y con alta selectividad, de modo que no hay necesidad de tener dos dominios separados presentes, ni para asegurar que estos dos dominios están presentes en la conformación y configuración espacial recta (es decir, a través del uso de enlazantes especialmente diseñados, como con scFv's);
- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos se pueden expresar de un gen único y no requieren doblez post-traduccional o modificaciones;
- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos fácilmente se pueden fabricar en formatos multivalentes y multiespecíficos (como se discute adicionalmente en la presente);
- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos son altamente solubles y no tienen una tendencia a agregarse (como con los dominios de enlace de antígeno derivados de ratón por Ward et al., Nature, Vol. 341, 1989, p. 544);
- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos son altamente estable al calor, pH, proteasas y otros agentes o condiciones desnaturalizadas (véase por ejemplo Ewert et al, supra);

- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos son fáciles y relativamente baratos de preparar, aún en una escala requerida para producción. Por ejemplo, los dominios V_{HH}, Nanocuerpos y proteínas/polipéptidos que contienen los mismos se pueden producir usando fermentación microbiana (por ejemplo como se describe adicionalmente posteriormente) y no requieren el uso de sistemas de expresión de mamífero, como con, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo convencional;
- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos son relativamente pequeños (aproximadamente 15 kDa, ó 10 veces menor que una IgG convencional) comparados con los anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de enlace de antígeno de los mismos, y por lo tanto muestran alta (mayor) penetración en los tejidos (incluyendo pero no limitado a tumores sólidos y otros tejidos densos) que tales anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de enlace de antígeno de los mismos;
- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos pueden mostrar propiedades de enlace de cavidad así llamadas (inter alia debido a su bucle CDR3 extendido, comparado con los dominios V_H convencionales) y por lo tanto también pueden acceder a objetivos y epítopes no accesibles por los anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de enlace de antígeno de los mismos. Por

200.

ejemplo, se ha mostrado que los dominios V_{HH} y Nanocuerpos pueden inhibir las enzimas (véase por ejemplo WO 97/49805; Transue et al., (1998), supra; Lauwereys et al., (1998), supra.

Como se mencionó anteriormente, la invención generalmente se refiere a Nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa, así como a polipéptidos que comprenden o esencialmente consisten de uno o más de tales Nanocuerpos, que se pueden usar para propósitos profilácticos, terapéuticos y/o de diagnóstico descritos posteriormente y en WO 04/041862.

También como se mencionó y describe adicionalmente posteriormente, la invención adicionalmente se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales Nanocuerpos y polipéptidos, a métodos para preparar tales Nanocuerpos y polipéptidos, a células hospedadoras que expresan o son capaces de expresar tales Nanocuerpos o polipéptidos, a usos de tales Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos o células hospedadoras, y a composiciones que comprenden tales Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos o células hospedadoras.

Generalmente, se deberá señalar que el término Nanocuerpo como se usa en la presente en su sentido más amplio no se limita a una fuente biológica específica o a un método específicos de preparación. Por ejemplo, como se

discutirá con más detalle posteriormente, los Nanocuerpos de la invención se pueden obtener (1) aislando el dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada que se presenta naturalmente; (2) por expresión de una secuencia de nucleótido que codifica un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente; (3) por "humanización" (como se describe posteriormente) de un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente o por expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio V_{HH} humanizado; (4) por "camelización" (como se describe posteriormente) de un dominio V_H que se presenta naturalmente de cualquier especie animal, en particular una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o por expresión de un ácido nucleico que codifica tal dominio V_H camelizado; (5) por "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "Dab" como se describe por Ward et al (supra), o por expresión de un ácido nucleico tal como un dominio V_H camelizado; (6) usando técnicas sintéticas o semi-sintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácido; (7) preparando un ácido nucleico que codifica un Nanocuerpo usando técnicas para síntesis de ácido nucleico, seguido por expresión del ácido nucleico así obtenido, y/o (8) por cualquier combinación de los anteriores. Los métodos y técnicas adecuadas para realizar lo anterior serán claros para la persona experta basado en la descripción en la

presente y por ejemplo incluyen los métodos y técnicas descritos con más detalles posteriormente.

Sin embargo, de conformidad con una modalidad específica, los Nanocuerpos de la invención no tienen una secuencia de aminoácido que es exactamente la misma como (es decir como un grado de identidad de secuencia de 100% con) la secuencia de aminoácido de un dominio V_H que se presenta naturalmente, tal como la secuencia de aminoácido de un dominio V_H que se presenta naturalmente de un mamífero, y en particular de un ser humano.

Una clase particularmente preferida de Nanocuerpos de la invención comprende Nanocuerpos con una secuencia de aminoácido que corresponde a la secuencia de aminoácido de un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente, pero que se ha "humanizado", es decir reemplazando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácido de la secuencia V_{HH} que se presenta naturalmente por uno o más de los residuos aminoácido que se presentan en las posiciones correspondientes en un dominio V_H de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (por ejemplo indicado anteriormente). Esto se puede realizar en una manera conocida per se, la cual será clara para la persona experta, por ejemplo en la base de la descripción adicional posteriormente y la técnica previa en la humanización referida en la presente. De nuevo, se deberá

señalar que tales Nanocuerpos humanizados de la invención se pueden obtener en cualquier manera conocida per ser (es decir como se indicó bajo los puntos (1)-(8) anteriores) y por consiguiente no son estrictamente limitados a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente como un material de partida.

Una sustitución humanizante preferida, pero no limitante de Nanocuerpos que pertenecen al grupo 103 P,R,S y/o el grupo GLEW (como se define en la presente) es 108Q a 108L.

Otra clase particularmente preferida de Nanocuerpos de la invención comprende Nanocuerpos con una secuencia de aminoácido que corresponde a la secuencia de aminoácido de un dominio V_H que se presenta naturalmente que se ha "camelizado", es decir reemplazando uno o más residuos aminoácido en la secuencia de aminoácido de un dominio V_H que se presenta naturalmente de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos aminoácido que se presentan en las posiciones correspondientes en un dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada. Esto se puede realizar en una manera conocida per se, la cual será clara para la persona experta, por ejemplo en la base de la descripción adicional posteriormente. También se hace referencia a WO 94/04678.

Tal camelización preferiblemente puede ocurrir en posiciones de aminoácido las cuales están presentes en la interfase V_H-V_L y en los residuos distintivos camélidos así llamados (véase por ejemplo también WO 94/04678), como también se menciona posteriormente. Preferiblemente, el dominio V_H o secuencia que se usa como un material de partida o punto de partida para generar o diseñar el Nanocuerpo camelizado preferiblemente es una secuencia de V_H de un mamífero, más preferiblemente la secuencia de V_H de un ser humano. Sin embargo, se deberá señalar que tales Nanocuerpos camelizados de la invención se pueden obtener en cualquier manera conocida per se (es decir como se indica bajo los puntos (1)-(8) anteriores) y por consiguiente no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_H que se presenta naturalmente como un material de partida.

Por ejemplo, de nuevo como se describe adicionalmente posteriormente, tanto "humanización" como "camelización" se pueden realizar proporcionando una secuencia de nucleótido que codifica tal dominio V_{HH} o dominio V_H que se presenta naturalmente, respectivamente, y luego cambiando, en una manera conocida per se, uno o más codones en la secuencia de nucleótido de modo que la nueva secuencia de nucleótido codifica un Nanocuerpo humanizado o

camelizado de la invención, respectivamente, y luego expresando la secuencia de nucleótido así obtenida en una manera conocida per se para proporcionar el Nanocuerpo deseado de la invención. Alternativamente, basado en la secuencia de aminoácido de un dominio V_{HH} o dominio V_H que se presenta naturalmente, respectivamente, la secuencia de aminoácido del Nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, se puede diseñar y luego sintetizar *de novo* usando técnicas para síntesis de péptido conocidas per se. Además, basado en la secuencia de aminoácido o secuencia de nucleótido de un dominio V_{HH} o dominio V_H que se presenta naturalmente, respectivamente, una secuencia de nucleótido que codifica el Nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, se pueden diseñar y luego sintetizar *de novo* usando técnicas para síntesis de ácido nucleico conocidas per se, después de lo cual la secuencia de nucleótido así obtenida se puede expresar en una manera conocida per se para proporcionar el Nanocuerpo deseado de la invención.

Otras formas y técnicas adecuadas para obtener Nanocuerpos de la invención y/o secuencias de nucleótido y/o ácidos nucleicos que codifican las mismas, partiendo de (la secuencia de aminoácido de) dominios V_H que se presentan naturalmente o preferiblemente dominios V_{HH} y/o de

las secuencias de nucleótido y/o secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas serán claras para la persona experta, y por ejemplo pueden comprender combinar una o más secuencias de aminoácido y/o secuencias de nucleótido de dominios V_H que se presentan naturalmente (tales como una o más FR's y/o CDR's) con una o más secuencias de aminoácido y/o secuencias de nucleótido de dominios V_{HH} que se presentan naturalmente (tal como una o más FR's o CDR's), en una manera adecuada para proporcionar (una secuencia de nucleótido o ácido nucleico codificante) un Nanocuerpo de la invención.

De conformidad con un aspecto preferido, pero no limitante del aspecto de la invención, un Nanocuerpo en su sentido más amplio se puede definir generalmente como un polipéptido que comprende:

a) una secuencia de aminoácido que está comprendida de cuatro regiones/secuencias de estructura interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las cuales el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat es Q;

y/o:

b) una secuencia de aminoácido que está comprendida de cuatro regiones/secuencias de estructura interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de

complementariedad, en las cuales el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad con la numeración Kabat es E y en las cuales el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat es un R;

y/o:

c) una secuencia de aminoácido que está comprendida de cuatro regiones/secuencias de estructura interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las cuales el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat es elegido del grupo que consiste de P, R y S, y es en particular elegido del grupo que consiste de R y S.

Por consiguiente, en un primer aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales

i) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat es Q;

y/o en las cuales:

ii) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad con la numeración Kabat es E y en la cual el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat es un R;

y/o en las cuales:

iii) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de P, R y S, y es en particular elegido del grupo que consiste de R y S;

y en las cuales

iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una o más de las definiciones preferidas anteriores.

En particular, un Nanocuerpo contra TNF-alfa de conformidad con la invención puede tener la estructura:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales

i) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat es Q;

y/o en las cuales:

ii) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad con la numeración Kabat es E y en la cual el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat es un R;

y/o en las cuales:

iii) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de P, R y S, y es en particular elegido del grupo que consiste de R y S;

y en las cuales

iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

En particular, de conformidad con un aspecto preferido, pero no limitante del aspecto de la invención, un Nanocuerpo generalmente se puede definir como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que está comprendida de cuatro regiones/secuencias de estructura interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las cuales;

a-1) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad

210.

con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de G, E, D, G, Q, R, S, L; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de G, E o Q; y

a-2) el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de L, R o C; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de L o R; y

a-3) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de W, R o S; y preferiblemente es W o R, y es muy preferiblemente W;

a-4) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat es Q;

o en las cuales:

b-1) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de E y Q; y

b-2) el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat es R; y

b-3) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de W, R y S; y es preferiblemente W;

b-4) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de Q y L; y es preferiblemente Q;

211

o en las cuales:

c-1) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de G, E, D, Q, R, S y L; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de G, E y Q; y

c-2) el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de L, R y C; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de L y R; y

c-3) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de P, R y S; y en particular se elige del grupo que consiste de R y S; y

c-4) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de Q y L; y es preferiblemente Q.

Por consiguiente, en otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad

con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de G, E, D, G, Q, R, S, L; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de G, E o Q;

y en las cuales:

ii) el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de L, R o C; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de L o R;

y en las cuales:

iii) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de W, R o S; y preferiblemente es W o R, y es más preferiblemente W;

y en las cuales

iv) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat es Q;

y en las cuales:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

213.

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de E y Q;

y en las cuales:

ii) el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat es R;

y en las cuales:

iii) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de W, R y S; y preferiblemente es W;

y en las cuales

iv) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat es Q;

y en las cuales:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

214

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) el residuo aminoácido en la posición 44 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de G, E, D, Q, R, S y L; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de G, E y Q;

y en las cuales:

ii) el residuo aminoácido en la posición 45 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de L, R y C; y preferiblemente se elige del grupo que consiste de L y R;

y en las cuales:

iii) el residuo aminoácido en la posición 103 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de P, R y S; y en particular se elige del grupo que consiste de R y S;

y en las cuales

iv) el residuo aminoácido en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat se elige del grupo que consiste de Q y L; preferiblemente es Q;

y en las cuales:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

Dos grupos particularmente preferidos, pero no limitantes de los Nanocuerpos de la invención son aquellos de conformidad con a) anterior; de conformidad con I) a a-4) anterior; de conformidad con b) anterior; de conformidad con b-1) a b-4) anteriores; de conformidad con c) anterior; y/o de conformidad con c-1) a c-4) anteriores, en los cuales;

a) los residuos aminoácido en las posiciones 44-47 de conformidad con la numeración Kabat forman la secuencia GLEW (o una secuencia tipo GLEW como se define posteriormente) y el residuo aminoácido en la posición 108 es Q;

en los cuales:

b) los residuos aminoácido en las posiciones 43-46 de conformidad con la numeración Kabat forman la secuencia KERE o KQRE (o una secuencia tipo KERE) y el residuo aminoácido en la posición 108 es Q o L, y preferiblemente es Q.

Por consiguiente, en otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) los residuos aminoácido en las posiciones 44-47 de conformidad con la numeración Kabat forman la secuencia GLEW (o una secuencia tipo GLEW como se define posteriormente) y el residuo aminoácido en la posición 108 es Q;

y en las cuales:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se

refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) los residuos aminoácido en las posiciones 43-46 de conformidad con la numeración Kabat forman la secuencia KERE o KQRE (o una secuencia tipo KERE) y el residuo aminoácido en la posición 108 es Q o L, y preferiblemente es Q;

y en las cuales:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

En los Nanocuerpos de la invención en los cuales los residuos aminoácido en las posiciones 43-46 de conformidad con la numeración Kabat forman la secuencia KERE o KQRE, el residuo aminoácido en la posición 37 es más preferiblemente F. En los Nanocuerpos de la invención en los cuales los residuos aminoácido en las posiciones 44-47 de conformidad con la numeración Kabat forman la secuencia GLEW, el residuo aminoácido en la posición 37 se elige del grupo que consiste de Y, H, I, V o F, y es más preferiblemente F.

Por consiguiente, sin que se limite a esto en

alguna forma, sobre la base de los residuos aminoácido presentes en las posiciones mencionadas anteriormente, los Nanocuerpos de la invención generalmente se pueden clasificar sobre la base de los siguientes tres grupos:

a) El "*grupo GLEW*": Nanocuerpos con la secuencia de aminoácido GLEW en las posiciones 44-47 de conformidad con la numeración Kabat y Q en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat. Como se describe adicionalmente en la presente, los Nanocuerpos dentro de este grupo usualmente tienen un V en la posición 37, y pueden tener un W, P, R o S en la posición 103, y preferiblemente tienen un W en la posición 103. El grupo GLEW también comprende algunas secuencias tipo GLEW tales como aquellas mencionadas en la tabla 2 posterior;

b) El "*grupo KERE*": Nanocuerpos con la secuencia de aminoácido KERE o KQRE en las posiciones 43-46 de conformidad con la numeración Kabat y Q o L en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat. Como se describe adicionalmente en la presente, los Nanocuerpos dentro de este grupo usualmente tienen un F en la posición 37, un L o F en la posición 47; y pueden tener un W, P, R o S en la posición 103, y preferiblemente tienen un W en la posición 103;

c) El "*grupo 103 P, R, S*": Nanocuerpos con un P, R o S en

la posición 103. Estos Nanocuerpos pueden tener ya sea la secuencia de aminoácido GLEW en las posiciones 44-47 de la numeración Kabat o la secuencia aminoácido KERE o KQRE en las posiciones 43-46 de conformidad con la numeración Kabat, la última más preferiblemente en combinación con un F en la posición 37 y un L o un F en la posición 47 (como se define para el grupo KERE); y pueden tener Q o L en la posición 108 de conformidad con la numeración Kabat; y preferiblemente tienen Q.

Por consiguiente, en otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede ser un Nanocuerpo que pertenece al grupo GLEW (como se define en la presente), y en el cual CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede ser un Nanocuerpo que pertenece al grupo KERE (como se define en la presente), y en el cual CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de

conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

Por consiguiente, en otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede ser un Nanocuerpo que pertenece al grupo 103 P, R, S (como se define en la presente), y en el cual CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

Además, más generalmente y además de los residuos 108Q, 43E/44R y 103 P, R, S mencionados anteriormente, los Nanocuerpos de la invención pueden contener, en una o más posiciones, en un dominio V_H convencional, que podrían formar (parte de) la interfase V_H/V_L, contener uno o más residuos aminoácido que son más altamente cargados que los residuos aminoácido que se presentan naturalmente en las mismas posiciones en el dominio V_H o V_{HH} que se presenta naturalmente correspondiente, y en particular uno o más residuos aminoácido cargados (como se menciona en la tabla 1).

Tales sustituciones incluyen, pero no se limitan a las secuencias tipo GLEW mencionadas en la tabla 2 posterior; así como las sustituciones que se describen en

la Solicitud Internacional WO 00/29004 para "*microcuerpos*" así llamados, por ejemplo un Q en la posición 108 y KLEW en las posiciones 44-47.

En algunas modalidades de los Nanocuerpos de la invención, el residuo aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste de L, M, S, V y W; y preferiblemente es L.

Además, en algunas modalidades de los Nanocuerpos de la invención, el residuo aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste de R, K, N, E, I y Q; y es más preferiblemente ya sea K o E (para Nanocuerpos correspondientes a dominios V_{HH} que se presentan naturalmente) o R (para Nanocuerpos "humanizados", como se describe posteriormente). El residuo aminoácido en la posición 84 en algunas modalidades se elige del grupo que consiste de P, A, R, S, D y V, y es más preferiblemente P (para Nanocuerpos correspondientes a dominios V_{HH} que se presentan naturalmente) o R (para Nanocuerpos "humanizados", como se describe posteriormente).

Además, en algunas modalidades de los Nanocuerpos de la invención, el residuo aminoácido en la posición 104 se elige del grupo que consiste de G y D; y es más preferiblemente G.

Colectivamente, los residuos aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108, los

cuales en los Nanocuerpos son como se mencionó anteriormente, serán referidos en la presente como los "*Residuos Distintivos*". Los residuos distintivos y los residuos aminoácido en las posiciones correspondientes del dominio VH humano más estrechamente relacionado, se resumen en la tabla 2.

Algunas combinaciones especialmente preferidas de estos residuos distintivos como se presentan en dominios V_{HH} que se presentan naturalmente se mencionan en la tabla 3. Para comparación, los residuos aminoácido correspondientes del V_H3 humano llamado DP-47 se han indicado en letras cursivas.

Tabla 2: Residuos Distintivos en Nanocuerpos

Posición	V_H3 humano	Residuos Distintivos
11	L, V; predominantemente L	L, M, S, V, W; preferiblemente L
37	V, I, F; usualmente V	F[1], Y, H, I o V, preferiblemente F[1] o Y
44[8]	G	G[2], E[3], D, Q, R, S, L; preferiblemente G[2], E[3] o Q; más preferiblemente G[2] o E[3].
45[8]	L	L[2], R[3], C, I, L, P, Q, V; preferiblemente L[2] o R[3]
47[8]	W, Y	W[2], L[1] o F[1], A, G, I, M, R, S, o Y; preferiblemente W[2], L[1], F[1] o R
83	R o K; usualmente R	R, K[5], N, E[5], I, M o Q; preferiblemente K o R; más preferiblemente K
84	A, T, D; predominantemente A	P[5], A, L, R, S, D, V; preferiblemente P
103	W	W[4], P[6], R[6], S; preferiblemente W
104	G	G o D; preferiblemente G
108	L, M o T; predominantemente L	Q, L[7] o R; preferiblemente Q o L[7]

Notas:

(1): En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE (SEC ID NO: 437) o KQRE (SEC ID NO: 438) en las posiciones 43-46.

(2): Usualmente como GLEW (SEC ID NO: 439) en las posiciones 44-47.

(3): Usualmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, por ejemplo como KEREL (SEC ID NO: 440), FEREF (SEC ID NO:441), KQREL (SEC ID NO: 442), KQREF (SEC ID NO: 443) o KEREG (SEC ID NO: 444) en las posiciones 43-47. Alternativamente, también las secuencias tales como TERE (SEC ID NO:445) (por ejemplo TEREL (SEC ID NO:446)), KECE (SEC ID NO:447) (por ejemplo KECEL (SEC ID NO:448) o KECER (SEC ID NO:449)), RERE (SEC ID NO:450) (por ejemplo REREG (SEC ID NO:451)), QERE (SEC ID NO:452) (por ejemplo QEREG (SEC ID NO:453)), KGRE (SEC ID NO:454) (por ejemplo KGREG (SEC ID NO:455)), KDRE (SEC ID NO:456) (por ejemplo KDREV (SEC ID NO:457)) son posibles. Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas incluyen por ejemplo DECKL (SEC ID NO:458) y NVCEL (SEC ID NO:459).

(4): Tanto con GLEW en las posiciones 44-47 como KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

(5): Frecuentemente como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios V_{HH} que se presentan naturalmente.

(6): En particular, pero no exclusivamente, en combinación con GLEW en las posiciones 44-47.

(7): Con la condición que cuando las posiciones 44-47 son GLEW, la posición 108 siempre es Q.

(8): El grupo GLEW también contiene secuencias tipo GLEW en las posiciones 44-47, tal como por ejemplo GVEW (SEC ID NO:460), EPEW (SEC ID NO:461), GLER (SEC ID NO:462), DQEW (SEC ID NO:463), DLEW (SEC ID NO:464), GIEW (SEC ID NO:465), ELEW (SEC ID NO:466), GPEW (SEC ID NO:467), EWLP (SEC ID NO:467), GPER (SEC ID NO:469), GLER (SEC ID NO:470) y ELEW.

Tabla 3: Algunas combinaciones preferidas de Residuos Distintivos en Nanocuerpos que se presentan naturalmente

Para humanización de estas combinaciones, se hace referencia a la especificación.

	11	**37**	**44**	**45**	**47**	**83**	**84**	**103**	**104**	**108**
DP-47 (humano)	*M*	*V*	*G*	*L*	*W*	*R*	*A*	*W*	*G*	*L*
grupo "KERE"	L	F	E	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	E	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
	L	Y	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	L	R	V	K	P	Q	G	Q
	L	F	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
grupo "GLEW"	L	V	G	L	W	K	S	W	G	Q
	M	V	G	L	W	K	P	R	G	Q

En los Nanocuerpos, cada residuo aminoácido en cualquier otra posición que los Residuos Distintivos puede ser cualquier residuo aminoácido que naturalmente se presenta en la posición correspondiente (de conformidad con la numeración Kabat) de un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente.

Tales residuos aminoácido serán claros para la persona experta. Las tablas 4-7 mencionan algunos residuos no limitantes que pueden estar presentes en cada posición (de conformidad con la numeración Kabat) de la FR1, FR2, FR3 y FR4 de dominios V_{HH} que se presentan naturalmente. Para cada posición, el residuo aminoácido que más frecuentemente se presenta en cada posición de un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente (y el cual es el residuo aminoácido más preferido para la posición en un Nanocuerpo) se indica en negrillas; y otros residuos aminoácido preferidos para cada posición se han subrayado (nota: el número de residuos aminoácido que se encuentran en las posiciones 26-30 de dominios V_{HH} que se presentan naturalmente soporta la hipótesis que fundamenta la numeración Chothia (supra) que los residuos en esta posiciones ya forman parte de CDR1).

En las tablas 4-7, algunos de los residuos no limitantes que pueden estar presentes en cada posición de un dominio V_H3 humano también se han mencionado. De nuevo,

para cada posición, el residuo aminoácido que más frecuentemente se presenta en cada posición de un dominio V_H3 humano que se presenta naturalmente se indica en negrillas; y otros residuos aminoácido preferidos se han subrayado.

Tabla 4: Ejemplos no limitantes de residuos aminoácido en FR1 (para las notas al pie, véase las notas al pie de la tabla 2)

Pos.	**Residuos aminoácido:**	
	V_H3 humano	*V_{HH}'s Camélidos*
1	**E**, Q	**Q**, A, E, D, H, R
2	**V**	**V**, A, E, G, L, M, Q
3	**Q**	**Q**, K, E, H, P, R, Y
4	**L**	**L**, F, P, R, V
5	**V**, L	**Q**, E, L, V, M, P, A, I
6	**E**	**E**, D, Q, A, H
7	**S**, T	**S**, F, H
8	**G**, R	**G**, A, R
9	**G**	**G**, E
10	**G**, V	**G**, D, R, A, E, N, T, V
11	**Residuo distintivo**: L, M, S, V, W, F, N, P, T, Y; preferiblemente L	
12	**V**, I	**V**, A, G, M
13	**Q**, K, R	**Q**, E, K, D, G, A, H, L, N, P, R, T
14	**P**	**A**, Q, A, G, P, T, V, E, F, I, N, S
15	**G**	**G**
16	**G**, R	**G**, A, E, D, N, P, R, S, V, W
17	**S**	**S**, F, T, N, P, A, C
18	**L**	**L**, V, M, Q, R
19	**R**, K	**R**, K, L, N, S, T, A, F, G, I, M, Q
20	**L**	**L**, F, I, V, M, S
21	**S**	**S**, F, T, G, H, P, A
22	**C**	**C**
23	**A**, T	**A**, D, P, S, T, V, E, G, I, L, Q, R
24	**A**	**A**, I, S, T, V, C, E, F, G, L, N, P, Q, Y

128

Tabla 4: Ejemplos no limitantes de residuos aminoácido en FR1 (continuación)

Pos.	Residuos aminoácido:	
	V_H3 humano	*V_{HH}'s Camélidos*
25	**S**	**S**, A, F, P, T, L, V
26	**G**	**G**, D, E, R, S, V, A, I, M, P, T
27	**F**	S, F, R, L, P, G, N, A, D, E, H, I, K, M, Q, T, V, Y
28	**T**	N, T, E, D, S, I, R, A, G, R, F, Y, L, M, P, V
29	**F**, V	F, L, D, S, I, G, V, A, E, P, T, Y
30	**S**, D, G	N, S, E, G, A, D, M, T, H, I, P, R, V, W

Tabla 5: Ejemplos no limitantes de residuos aminoácido en FR2 (para las notas al pie, véase las notas al pie de la tabla 2)

Pos.	Residuos aminoácido:	
	V_H3 humano	*V_{HH}'s Camélidos*
36	**W**	**W**
37	**Residuo distintivo:** $F^{(1)}$, Y, H, I, A, L, P, S o V, preferiblemente $F^{(1)}$ o Y	
38	**R**	**R**
39	**Q**	**Q**, H, P, R, A, D, G, L, E
40	**A**	**A**, F, G, P, T, V, I, L, N, R, S, Y
41	**P**, S, T	**P**, A, L, S, I, Q, T
42	**G**	**G**, E, D, R, T, V
43	**K**	**K**, D, E, N, Q, R, T, V, A, L, M, S
44	**Residuo distintivo:** $G^{(2)}$, $E^{(3)}$, D, Q, R, S, L, A, F, K, M, N, P, V, W, Y; preferiblemente $G^{(2)}$, $E^{(3)}$ o Q; más preferiblemente $G^{(2)}$ o $E^{(3)}$	
45	**Residuo distintivo:** $L^{(2)}$, $R^{(3)}$, C, I, L, P, Q, V, D, E, G, H, K, T; preferiblemente $L^{(2)}$ o $R^{(3)}$	

46	**E**, V	**E**, D, K, Q, V, A, G, N
47	**Residuo distintivo:** $W^{(2)}$, $L^{(1)}$ o $F^{(1)}$, A, G, I, M, R, S, D, E, H, K, Q, T, V o Y; preferiblemente $W^{(2)}$, $L^{(1)}$, $F^{(1)}$ o R	
48	**V**	**V**, I, L, A, C, E, F, G, H, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
49	**S**, A, G	**A**, S, A, G, T, V, D, E, I, L, Q, R, Y

Tabla 6: Ejemplos no limitantes de residuos aminoácido en FR3 (para las notas al pie, véase las notas al pie de la tabla 2)

Pos.	**Residuos aminoácido:**	
	V_H3 humano	*V_{HH}'s Camélidos*
66	**R**	**R**
67	**F**	**F**, L, V, A, D, I, S, Y
68	**T**	**T**, A, S, D, F, , I, K, N
69	**I**	**I**, M, V, A, F, L, R, S, T
70	**S**	**S**, A, F, E, G, K, P, T, V
71	**R**	**R**, G, I, K, Q, S, T, W, A, F, L, M, N
72	**D**, E	**D**, E, G, N, V, A, H, I, L, Q, S, T
73	**N**, D, G	**N**, D, F, I, K, S, T, Y, A, G, H, L, M, R, V
74	**A**, S	**A**, D, G, N, P, S, T, F, H, I, L, R, V, Y
75	**K**	**K**, A, E, K, L, N, Q, R, D, G, I, M, S, T, V, W
76	**N**, S	**N**, D, K, R, S, T, Y, E, G, H, I, Q
77	S, T, I	**T**, A, E, I, M, S, K, L, N, R, V
78	**L**, A	**V**, L, A, F, G, I, M, E, N, Q, R, S, T, W
79	**Y**, H	**Y**, A, D, F, H, S, T, C, E, I, L, N, V, W
80	**L**	**L**, F, V, M

230.

Tabla 6: Ejemplos no limitantes de residuos aminoácido en FR3 (continuación)

Pos.	Residuos aminoácido:	
	V_H3 humano	*V_{HH}'s Camélidos*
81	**Q**	**Q**, E, R, T, G, H, I, K, L, M, N
82	**M**	**M**, I, L, V, G, P, T
82A	**N**, G	**N**, D, G, H, S, T, A ,E, I, K, R, V
82B	**S**	**S**, N, D, G, R, A, C, E, F, I, K, M, P, T, V
82C	**L**	**L**, P, M, T, V
83	**Residuo distintivo:** R, K[5], N, E[5], I, M, A, D, G, L, Q, S, T o Q; preferiblemente K o R; más preferiblemente K	
84	**Residuo distintivo:** P[5], A, L, R, S, D, V, F, G, H, N, T, Y; preferiblemente P	
85	**E**, G	**E**, D, G, Q, A, N, R, V, Y
86	**D**	**D**, E, F, Y
87	**T**, M	**T**, S, A, C, M
88	**A**	**A**, G, S, D, L, N, P
89	**V**, L	**V**, A, D, I, L, M, N, R, T, E, F, S
90	**Y**	**Y**, F, E, H, N
91	**Y**, H	**Y**, D, F, H, L, S, T, V, C, I, N, R, W
92	**C**	**C**
93	**A**, K, T	**A**, N, G, H, K, R, S, T, V, Y, E, F, I, L, M, Q
94	**K**, R, T	**A**, V, C, F, G, I, L, R, S, D, E, K, M, N, P, Q, T, W, Y, T o K;

Tabla 7: Ejemplos no limitantes de residuos aminoácido en FR4 (para las notas al pie, véase las notas al pie de la tabla 2)

Pos.	Residuos aminoácido:	
	V_H3 humano	*V_{HH}'s Camélidos*
103	**Residuo distintivo:** W[4], P[6], R[6], S, F, G, K, L, N, Q, V, Y; preferiblemente W	
104	**Residuo distintivo:** G, A, R, S, T o D; preferiblemente G	

Pos.	Residuos aminoácido:	
	V_H3 humano	*V_{HH}'s Camélidos*
103	**Residuo distintivo:** W[4], P[6], R[6], S, F, G, K, L, N, Q, V, Y; preferiblemente W	
104	**Residuo distintivo:** G, A, R, S, T o D; preferiblemente G	
105	**Q**, R	**Q**, E, K, P, R, G, H, L, S, V
106	**G**	**G**
107	**T**	**T**, A, I, N, P
108	**Residuo distintivo:** Q, L[7], E, H, N, P, T o R; preferiblemente Q o L[7]	
109	**V**	**V**
110	**T**	**T**, I, A
111	**V**	**V**, A, I, G
112	**S**	**S**, F, A, L, P, T, Y
113	**S**	**S**, A, L, P, F, T

Por consiguiente en otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) los residuos distintivos son como se definieron anteriormente;

y en las cuales:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más

preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) FR1 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[1] QVQLQESGGG**X**VQAGGSLRLSCAASG [26] [SEC ID NO: 1]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la secuencia de aminoácido anterior; en la cual

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores:

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

y en las cuales:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[36] W**X**RQAPGK**XX**E**X**VA [49] [SEC ID NO: 2]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la secuencia de aminoácido anterior; en la cual

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de

aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

y en las cuales:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSL**XX**EDTAVYYCAA [94] [SEC ID NO: 3]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la secuencia de aminoácido anterior; en la cual

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como

se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

y en las cuales:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[103]**XX**QGT**X**VTVSS [113] [SEC ID NO: 4]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la secuencia de aminoácido anterior; en la cual

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 7; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 7; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

y en las cuales:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores;

en las cuales los residuos distintivos se indican por "**X**" y son como se definieron anteriormente y en las cuales los números entre corchetes se refieren a las posiciones de aminoácido de conformidad con la numeración Kabat.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) FR1 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[1] QVQLQESGGG**L**VQAGGSLRLSCAASG [26] [SEC ID NO: 5]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la secuencia de aminoácido anterior; en la cual

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido

140

anteriores;

(3) el residuo distintivo en la posición es como se indicó en la secuencia anterior;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) el residuo distintivo en la posición es como se indicó en la secuencia anterior;

y en las cuales:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido:

[36] W**F**RQAPGK**ER**E**L**VA [49] [SEC ID NO: 6]

241

[36] W**F**RQAPGK**ER**E**F**VA [49] [SEC ID NO: 7]

[36] W**F**RQAPGK**ER**E**G**A [49] [SEC ID NO: 8]

[36] W**F**RQAPGK**QR**E**L**VA [49] [SEC ID NO: 9]

[36] W**F**RQAPGK**QR**E**F**VA [49] [SEC ID NO: 10]

[36] W**Y**RQAPGK**GL**E**W**A [49] [SEC ID NO: 11]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores; en las cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido

anteriores;

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indicaron en cada una de las secuencias anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste de la secuencia de

243.

aminoácido:

[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSL**KP**EDTAVYYCAA [94] [SEC ID NO: 12]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la secuencia de aminoácido anterior; en la cual

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1

"diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido:

[103] **WG**QGT**Q**VTVSS [113] [SEC ID NO: 13]

[103] **WG**QGT**L**VTVSS [113] [SEC ID NO: 14]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de la secuencia de aminoácido anterior; en la cual

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores;

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

246.

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

147

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) FR1 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[1] QVQLQESGGG**L**VQAGGSLRLSCAASG [26] [SEC ID NO: 5]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

248

(3) el residuo distintivo en la posición es como se indicó en la secuencia anterior;

y en las cuales:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido:

[36] W**F**RQAPGK**ER**E**L**VA [49] [SEC ID NO: 6]

[36] W**F**RQAPGK**ER**E**F**VA [49] [SEC ID NO: 7]

[36] W**F**RQAPGK**ER**E**G**A [49] [SEC ID NO: 8]

[36] W**F**RQAPGK**QR**E**L**VA [49] [SEC ID NO: 9]

[36] W**F**RQAPGK**QR**E**F**VA [49] [SEC ID NO: 10]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente

solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSL**KP**EDTAVYYCAA [94] [SEC ID NO: 12]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y

ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido:

[103] **WG**QGT**Q**VTVSS [113] [SEC ID NO: 13]

[103] **WG**QGT**L**VTVSS [113] [SEC ID NO: 14]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como

281

se definió en la tabla 7; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) FR1 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

252

[1] QVQLQESGGG**L**VQAGGSLRLSCAASG [26] [SEC ID NO: 5]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) el residuo distintivo en la posición es como se indicó en la secuencia anterior;

y en las cuales:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[36] W**Y**RQAPGK**GL**E**W**A [49] [SEC ID NO: 11]

253

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSL**KP**EDTAVYYCAA [94] [SEC ID NO: 12]

254

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido:

[103] **WG**QGT**Q**VTVSS [113] [SEC ID NO: 13]

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 7; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indican en cada una de las secuencias anteriores;

y en las cuales:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más

25C

preferidas anteriores.

Algunas secuencias de estructura que pueden estar presentes en los Nanocuerpos de la invención se pueden encontrar en la patente Europea 656 946 mencionada anteriormente (véase por ejemplo también la equivalente US otorgada 5,759,808).

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la cual FR1 a FR4 se refieren a regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en las cuales CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en las cuales:

i) FR1 se elige del grupo que consiste de las secuencias FR1 presentes en los Nanocuerpos de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99,

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias FR1; en las cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier

254.

posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia FR1; y

(3) el residuo distintivo en la posición es como se indicó en la secuencia FR1;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias FR1, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 4; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido,

comparada con la secuencia FR1; y

(3) el residuo distintivo en la posición es como se indicó en la secuencia FR1;

y en las cuales:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste de las secuencias FR2 presentes en los Nanocuerpos de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99,

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias FR2; en las cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia FR2; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indican en la secuencia FR2;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias FR2, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 5; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia FR2; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indican en la secuencia FR2;

iii) FR3 se elige del grupo que consiste de las secuencias FR3 presentes en los Nanocuerpos de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de SEC ID

280.

NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99,

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias FR3; en las cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia FR3; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son como se indican en la secuencia FR3;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias FR3, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier

posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia FR3; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son como se indican en la secuencia FR3;

iv) FR4 se elige del grupo que consiste de las secuencias FR4 presentes en los Nanocuerpos de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99,

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias FR4; en las cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de

aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia FR4; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indican en la secuencia FR4;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia(s) de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las secuencias FR4, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva preferiblemente es ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se definió en la tabla 6; y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia FR4; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indican en la secuencia FR4;

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y preferiblemente son como se definen de conformidad con una de las definiciones preferidas anteriores, y son más preferiblemente como se definen de conformidad con una de las definiciones más preferidas anteriores.

Algunos Nanocuerpos particularmente preferidos de la invención se pueden elegir del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99 o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define anteriormente) con una de las secuencias de aminoácido de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99; en las cuales

(1) los residuos distintivos pueden ser como se indica en la tabla 2 anterior;

(2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es

preferiblemente ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se define en las tablas 4-7; y/o

(3) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con las secuencias de aminoácido anteriores.

Algunos Nanocuerpos aún más particularmente preferidos de la invención se pueden elegir del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99 o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define anteriormente) con una de las secuencias de aminoácido de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99; en las cuales

(1) los residuos distintivos son como se indican en la secuencia pertinente elegida de las SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99;

(2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferiblemente ya sea una sustitución de aminoácido conservadora (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se define en las tablas 4-7; y/o

(3) la secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y ningunas supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la secuencia pertinente elegida de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99.

Algunos de los Nanocuerpos más preferidos de la invención se pueden elegir del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido de SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99, y en particular de los Nanocuerpos humanizados de SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99.

Como será claro de lo anterior, el término Nanocuerpos de la invención como se usa en la presente en su sentido más amplio también comprende mutantes naturales y sintéticos, variantes, alelos, análogos y ortólogos (posteriormente colectivamente referidos como "*análogos*") de los Nanocuerpos mencionados en las SEC ID NO's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o SEC ID NO's 95 a 99.

Generalmente, tales análogos, por ejemplo, pueden comprender secuencias homólogas, porciones funcionales, o una porción funcional de una secuencia homóloga (como se define adicionalmente posteriormente) de un Nanocuerpo. Generalmente, en tales análogos, cada residuo aminoácido (diferente del residuo distintivo) en cada una de las regiones de estructura se puede reemplazar por cualquier otro residuo aminoácido, siempre que el grado total de identidad de secuencia de las regiones de estructura permanezca como se definió anteriormente. Preferiblemente, sin embargo, en tales análogos:

- uno o más residuos aminoácido en las secuencias de estructura anteriores se reemplazan por uno o más residuos aminoácido que se presentan naturalmente en la misma posición en un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente. Algunos ejemplos de tales sustituciones se mencionan en las tablas 4-7 anteriores;

y/o:

- uno o más residuos aminoácido en las secuencias de estructura anteriores se reemplazan por uno o más residuos aminoácido que se pueden considerar una sustitución de aminoácido "conservadora", como se describió anteriormente;

y/o:

- uno o más residuos aminoácido en las secuencias de

estructura anteriores se reemplazan por uno o más residuos aminoácido que se presentan naturalmente en la misma posición en un dominio V_H que se presenta naturalmente de un ser humano. Esto es generalmente referido como "humanización" del Nanocuerpo/V_{HH} que se presenta naturalmente en general y de la posición en particular, y será discutido con más detalle posteriormente;

y:

- las posiciones para las cuales solamente un residuo aminoácido se menciona tanto para el dominio V_H como el dominio V_{HH} en las tablas 4-7 anteriores son preferiblemente no reemplazadas.

Además, aunque generalmente es menos preferido, en tales análogos, uno o más residuos aminoácido se pueden suprimir de las regiones de estructura y/o insertan en las regiones de estructura (opcionalmente además de una o más sustituciones de aminoácido como se mencionó anteriormente), siempre que el grado total de identidad de secuencia de las regiones de estructura permanezca como se definió anteriormente. Los residuos distintivos no se deberán suprimir. Además, muy preferiblemente, los residuos aminoácido para los cuales solamente un residuo aminoácido se menciona tanto para el dominio V_H como el dominio V_{HH} en las tablas 4-7 anteriores preferiblemente no se suprimen.

Preferiblemente, tales análogos deberán ser tales que aún pueden enlazar, tener afinidad para y/o tener especificidad para TNF-alfa, es decir con una afinidad y/o una especificidad la cual es al menos 10%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o más, de la afinidad y/o especificidad de al menos uno de los Nanocuerpos de SEC ID No's 52 a 60, SEC ID NO's 76 a 86 o EC ID NO's 95 a 99, como se determina usando un ensayo adecuado, por ejemplo un ensayo para determinar el enlace del análogo a TNF, y en particular uno de los ensayos como se usan en los ejemplos posteriores.

Generalmente, tales análogos, por ejemplo, se pueden obtener proporcionando un ácido nucleico que codifica un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente, cambiando los codones para uno o más residuos aminoácido que serán humanizados en los codones para los residuos aminoácido humanos correspondientes, expresando la secuencia de ácido nucleico/nucleótido así obtenida en un sistema de expresión u hospedador adecuado; y opcionalmente aislando y/o purificando el análogo así obtenido para proporcionar el análogo en forma esencialmente aislada (como se definió anteriormente). Esto generalmente se puede realizar usando métodos y técnicas conocidas per se, las

cuales serán claras para la persona experta, por ejemplo de los manuales y referencias citadas en la presente y/o de la descripción adicional posterior. Alternativamente, y por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un análogo se puede sintetizar en una manera conocida per se (por ejemplo usando un aparato automatizado para sintetizar secuencias de ácido nucleico con una secuencia de aminoácido preferida) y se puede expresar en un sistema de expresión u hospedador adecuado, en el cual el análogo así obtenido opcionalmente se puede aislar y/o purificar para proporcionar el análogo en forma esencialmente aislada (como se definió anteriormente). Otra forma de proporciona los análogos involucra síntesis química de la secuencia de aminoácido pertinente usando técnicas para síntesis de péptido conocidas per se, tales como aquellas mencionadas posteriormente.

También generalmente será claro para la persona experta que los Nanocuerpos (incluyendo análogos de los mismos) también se pueden preparar partiendo de secuencias V_H humanas (es decir, secuencias de aminoácido o las secuencias de nucleótido correspondientes), tal como por ejemplo secuencias de V_H3 humano tales como DP-47, DP-51, DP-54 o DP-29, cambiando uno o más residuos aminoácido en la secuencia de aminoácido del dominio V_H humano, para proporcionar una secuencia de aminoácido que tiene (a) un Q

en la posición 108; y/o (b) E en la posición 44 y/o R en la posición 45, y preferiblemente E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103, como se describió anteriormente. De nuevo, esto generalmente se puede realizar usando los diversos métodos y técnicas relacionadas con el párrafo previo, usando una secuencia de aminoácido y/o secuencia de nucleótido para un dominio V_H humano como un punto de partida.

El término Nanocuerpos como se usa en la presente en su sentido más amplio también comprende partes o fragmentos de los Nanocuerpos (incluyendo análogos) de la invención como se definió anteriormente, los cuales de nuevo pueden ser como se describe adicionalmente posteriormente.

Generalmente, las partes o fragmentos de los Nanocuerpos y/o análogos tienen secuencias de aminoácido en las cuales, comparadas con la secuencia de aminoácido del Nanocuerpo de longitud completa correspondiente o análogo, uno o más de los residuos aminoácido en el extremo N-terminal, uno o más residuos aminoácido en el extremo C-terminal, uno o más residuos aminoácido internos contiguos, o cualquier combinación de los mismos, se han suprimido y/o removido. También es posible combinar una o más de tales partes o fragmentos para proporcionar un Nanocuerpo de la invención.

271

Preferiblemente, la secuencia de aminoácido de un Nanocuerpo que comprende una o más partes o fragmentos de un Nanocuerpo de longitud completa y/o análogo deberá tener un grado de identidad de secuencia de al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, tal como al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%, con la secuencia de aminoácido del Nanocuerpo de longitud completa correspondiente.

Además, la secuencia de aminoácido de un Nanocuerpo que comprende una o más partes o fragmentos de un Nanocuerpo de longitud completa y/o análogo es preferiblemente tal que comprende al menos 10 residuos aminoácido contiguos, preferiblemente al menos 20 residuos aminoácido contiguos, más preferiblemente al menos 30 residuos aminoácido contiguos, tal como al menos 40 residuos aminoácido contiguos, de la secuencia de aminoácido del Nanocuerpo de longitud completa correspondiente.

Generalmente, tales partes o fragmentos de los Nanocuerpos de la invención tendrán secuencias de aminoácido en las cuales, comparadas con la secuencia de aminoácido del Nanocuerpo de longitud completa correspondiente de la invención, uno o más residuos aminoácido en el extremo N-terminal, uno o más residuos aminoácido en el extremo C-terminal, uno o más residuos

272

aminoácido internos contiguos, o cualquier combinación de los mismos, se han suprimido y/o removido. También es posible combinar una o más de tales partes o fragmentos para proporcionar un Nanocuerpo de la invención.

De conformidad con una modalidad preferida, un fragmento como se usa en la presente comprende al menos una de las CDR's presentes en un Nanocuerpo de tamaño completo de la invención, preferiblemente al menos dos de las CDR's presentes en un Nanocuerpo de tamaño completo de la invención, más preferiblemente al menos CDR2 y CDR3 presentes en un Nanocuerpo de tamaño completo de la invención, tal como por ejemplo todas las tres CDR's presentes en un Nanocuerpo de tamaño completo de la invención.

De conformidad con otra modalidad particularmente preferida, pero no limitante, tal parte o fragmento comprende al menos FR3, CDR3 y FR4 del Nanocuerpo de longitud completa correspondiente de la invención, es decir, como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 03/050531 (Lasters et al.).

Preferiblemente, tales partes o fragmentos deberán ser tales que aún pueden enlazar, tener afinidad para y/o tener especificidad para TNF-alfa, es decir con una afinidad y/o una especificidad la cual es al menos 10%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos

70%, aún más preferiblemente al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o más, de la afinidad y/o especificidad del Nanocuerpo de tamaño completo correspondiente de la invención, por ejemplo un ensayo para determinar el enlace del análogo a TNF, y en particular uno de los ensayos como se usan en los ejemplos posteriores.

A partir de la descripción anterior, será claro que las secuencias de aminoácido de los Nanocuerpos usados en la presente difieren en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones de estructura de las secuencias de aminoácido de dominios V_H que se presentan naturalmente, tales como las secuencias de aminoácido de los dominios V_H que se presentan naturalmente de anticuerpos de seres humanos. En particular, será claro que las secuencias de aminoácido de los Nanocuerpos usados en la presente difieren en al menos uno de los residuos distintivos de secuencias de aminoácido de dominios V_H que se presentan naturalmente, tales como secuencia de aminoácido de dominios V_H que se presentan naturalmente de anticuerpos de Camélidos y/o seres humanos.

Por consiguiente, de conformidad con una modalidad específica, un Nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácido que difiere en al menos una posición de aminoácido en una de las regiones de estructura de la secuencia de aminoácido de un dominio V_H que se

presenta naturalmente. De conformidad con una modalidad más específica, pero no limitante de la invención, un Nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácido que difiere al menos uno de los residuos distintivos de la secuencia de aminoácido de un dominio V_H que se presenta naturalmente.

A partir de la descripción anterior, será claro que las secuencias de aminoácido de algunos de los Nanocuerpos de la invención, tales como Nanocuerpos humanizados de la invención, diferirán en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones de estructura (es decir, ya sea en la posición de un residuo distintivo o en otra posición) de las secuencias de aminoácido de dominios V_{HH} que se presentan naturalmente. Por consiguiente, de conformidad con una modalidad específica, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención tiene la secuencia de aminoácido que difiere a por lo menos en una posición de aminoácido en una de las regiones de estructura de la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} que se presenta en forma natural. De conformidad con una modalidad más específica, pero no limitativa de la invención, un Nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de al menos uno de los residuos Hallmark de la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} que se presenta de forma natural.

La invención en su sentido más amplio también comprende derivados de los Nanocuerpos de la invención. Tales derivados generalmente se pueden obtener por modificación, y en particular por modificación química y/o biológica (por ejemplo, enzimática), de los Nanocuerpos de la invención y/o de uno o más de los residuos de aminoácidos que forman los Nanocuerpos de la invención.

Los ejemplos de tales modificaciones, así como también ejemplos de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de Nanocuerpos que se pueden modificar de tal manera (es decir, ya sea en el esqueleto de proteína pero preferiblemente en una cadena lateral), métodos y técnicas que se pueden usar para introducir tales modificaciones y los usos potenciales y ventajas de tales modificaciones será claro para la persona experta.

Por ejemplo, una modificación puede involucrar la introducción (por ejemplo, por enlace covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, residuos o porciones en o sobre el Nanocuerpo de la invención, y en particular de uno o más grupos funcionales, residuos o porciones que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas para el Nanocuerpo de la invención. Un ejemplo de tales grupos funcionales será evidente para la persona experta.

Por ejemplo, tal modificación puede comprender la

introducción (por ejemplo por enlace covalente o en cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales que lo que incrementa la media vida, la solubilidad y/o la absorción del Nanocuerpo de la invención, que reduce la inmunogenicidad y/o la toxicidad del Nanocuerpo de la invención, que elimina o atenúa cualesquiera efectos laterales indeseables del Nanocuerpo de la invención, y/o que confiere otras propiedades ventajosas y/o reduce las propiedades indeseadas de los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención; o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. Los ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para introducirlos será claro para la persona experta, y generalmente puede comprender todos los grupos funcionales y técnicas mencionadas en la técnica anterior general citada anteriormente en la presente así como también los grupos funcionales y técnicas conocidas per se para la modificación de proteínas farmacéuticas, y en particular para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (incluyendo anticuerpos de dominio único y ScFv's), para lo cual se hace referencia por ejemplo a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Por ejemplo, tales grupos funcionales se pueden enlazar directamente (por ejemplo covalentemente) a un Nanocuerpo de la invención, u

opcionalmente vía un enlazador o espaciador adecuado, como será evidente nuevamente para la persona experta.

Una de las técnicas más ampliamente usadas para incrementar la media vida y/o reducir la inmunogenicidad de proteínas farmacéuticas comprende unir un polímero farmacéuticamente aceptable adecuado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) o derivados de los mismos (tal como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). Generalmente, se puede usar cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de dominio (único) y ScFv's); se hace referencia por ejemplo a Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-454 (2002); por Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), por Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en WO 04/060965. Varios reactivos por pegilación de proteínas también están disponibles comercialmente, por ejemplo de Nektar Therapeutics, USA.

Preferiblemente, se usa pegilación dirigida al sitio, en particular vía un residuo de cisteína (ver por ejemplo Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este propósito, PEG se puede unir a un residuo de cisteína que se presenta en forma natural en un Nanocuerpo de la invención, un Nanocuerpo de la

invención se puede modificar para introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG se puede fusionar al N- y/o C-término de un Nanocuerpo de la invención, usando todas las técnicas de ingeniería de proteína conocidas per se para la persona experta.

Preferiblemente, para los Nanocuerpos y proteínas de la invención, un PEG se usa con un peso molecular de más de 5000, tal como más de 10,000 y menos de 200,000, tal como menos de 100,000; por ejemplo en el intervalo de 20,000-80,000.

Con respecto a la pegilación, se deberá señalar que generalmente, la invención también se incluye cualquier Nanocuerpo de la invención y/o polipéptido de la invención que ha sido pegilado en una o más posiciones de aminoácidos, preferiblemente en una forma en que la pegilación ya sea (1) incremente la media vida in vivo; (2) reduzca la inmunogenicidad; (3) proporcione una o más propiedades benéficas adicionales conocidas per se para pegilación; (4) no afecte esencialmente la afinidad del Nanocuerpo y/o polipéptido para TNF-alfa (por ejemplo, no reduce la afinidad por más de 90%, preferiblemente no más de 50%, y en forma más preferible por no más de 10%, como se determina por un ensayo adecuado, tales como aquellos

descritos en los Ejemplos posteriores); y/o (4) no afecte cualquiera de las otras propiedades deseadas de los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención. Los métodos y grupos PEG adecuados para unirlos, ya sea específicamente o no específicamente, será evidente para la persona experta. Los kits y reactivos adecuados para tal pegilación se pueden obtener por ejemplo de Nektar (CA, USA).

Otros, usualmente modificaciones menos preferidas comprenden glicosilación de enlace N o de enlace O, usualmente como parte de la modificación co-traduccional y/o post-traduccional, dependiendo de la célula hospedadora usada para expresar el Nanocuerpo o polipéptido de la invención.

Todavía otra modificación puede comprender la introducción de una o más etiquetas detectables u otros grupos o porciones que generan la señal, dependiendo del uso pretendido del Nanocuerpo etiquetado. Las etiquetas y técnicas adecuadas para enlazar, usar y detectarlos será evidente para la persona experta, y por ejemplo incluye, pero no se limita a, etiquetas fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina y metales fluorescentes tales como ^{152}Eu u otros metales de la serie lantánido), etiquetas fosforescentes, etiquetas quimioluminiscentes o etiquetas bioluminiscentes (tales

como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radio-isótopos (tales como ^{3}H, ^{125}I, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, ^{51}Cr, ^{36}Cl, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, y ^{75}Se), metales, quelatos de metales o cationes metálicos (por ejemplo cationes metálicos tales como ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}I, ^{97}Ru, ^{67}Cu, ^{67}Ga, y ^{68}Ga u otros metales o cationes metálicos que son particularmente adecuados para uso de diagnóstico y formación de imagen in vivo, in vitro o in situ, tales como (^{157}Gd, ^{55}Mn, ^{162}Dy, ^{52}Cr, y ^{56}Fe), así como cromóforos y enzimas (tal como malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, levadura de alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotinavidin peroxidasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, calatasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogensas, glucoamilasa y acetilcolina esterasa). Otras etiquetas adecuadas serán claras para la persona experta y por ejemplo incluyen porciones que se pueden detectar usando espectroscopia de RMN o ESR.

Tales Nanocuerpos y polipéptidos etiquetados de la invención, por ejemplo, se pueden usar para ensayos in vitro, in vivo o in situ (incluyendo inmunoensayos per se tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de

intercalación", etc.) así como también para propósitos de diagnóstico y formación de imagen in vivo, dependiendo de la elección de la etiqueta específica.

Como será claro para la persona experta, otra modificación puede involucrar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo para quelar uno de los metales o cationes metálicos referidos anteriormente. Los grupos quelantes adecuados, por ejemplo incluyen, sin limitación, ácido dietilentriaminpentaacético (DTPA) o ácido etilendiamintetraacético (EDTA).

Todavía otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que es una parte de un par de enlace específico, tal como el par de enlace biotina-(estrept)avidina. Tal grupo funcional se puede usar para enlazar el Nanocuerpo de la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de enlace, es decir a través de la formación del par de enlace. Por ejemplo, un Nanocuerpo de la invención se puede conjugar a biotina, y se enlaza a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado a avidina o estreptavidina. Por ejemplo, tal Nanocuerpo conjugado se puede usar como un reportero, por ejemplo en un sistema de diagnóstico donde un agente productor de señal detectable se conjuga a avidina o estreptavidina. Tales pares de enlace, por ejemplo, también se pueden usar para enlazar el

282

Nanocuerpo de la invención a un portador, incluyendo los portadores adecuados para propósitos farmacéuticos. Un ejemplo no limitante son las formulaciones liposomales descritas por Cao and Suresh, Journal of Drug Targetting, 8, 4, 257 (2000). Tales pares de enlace también se pueden usar para enlazar un agente terapéuticamente activo al Nanocuerpo de la invención.

Para algunas aplicaciones, en particular para aquellas aplicaciones en las cuales se propone aniquilar una célula que expresa el objetivo contra el cual los Nanocuerpos de la invención se dirigen (por ejemplo, en el tratamiento de cáncer), o reducir o alentar el crecimiento y/o proliferación tal como una célula, los nanocuerpos de la invención también se pueden enlazar a una toxina o a una porción o residuo tóxico. Los ejemplos de porciones, compuestos o residuos tóxicos los cuales se pueden enlazar a un Nanocuerpo de la invención para proporcionar - por ejemplo - un compuesto citotóxico serán claros para la persona experta y por ejemplo se pueden encontrar en la técnica previa citada anteriormente y/o en la descripción adicional en la presente. Un ejemplo es la tecnología ADEPT™ así llamada WO 03/055527.

Otras modificaciones químicas y enzimáticas potenciales serán claras para la persona experta. Tales modificaciones también se pueden introducir para propósitos

de investigación (por ejemplo, para estudiar relaciones de función-actividad). Por ejemplo, se hace referencia a Lundblad and Bradshaw, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 143-151 (1997).

Como se mencionó anteriormente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que comprenden al menos un dominio V_{HH} (es decir como se identifica usando los métodos de la invención) o al menos un Nanocuerpo basado en estos.

De acuerdo a una modalidad no limitante de la invención, tal polipéptido de la invención esencialmente consiste de un Nanocuerpo. Por "esencialmente consiste de" significa que la secuencia de aminoácido del polipéptido de la invención ya sea es exactamente lo mismo como la secuencia de aminoácido de un Nanocuerpo (como se menciona anteriormente) o corresponde a la secuencia de aminoácido de un Nanocuerpo, en el cual un número limitado de residuos de aminoácido, tal como 1-10 residuos de aminoácido y preferiblemente 1-6 residuos de aminoácido, tal como 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácido, se agregan al extremo amino terminal, al extremo carboxi terminal o ambos al extremo amino terminal y al extremo carboxi terminal de la secuencia de aminoácido del Nanocuerpo.

Tales residuos de aminoácido pueden o no pueden cambiar, alterar o de otra forma influenciar las

propiedades (biológicas) del Nanocuerpo y pueden o no pueden agregar funcionalidad adicional al Nanocuerpo. Por ejemplo, tales residuos de aminoácido.

a) pueden comprender un residuo Met N-terminal, por ejemplo como resultado de expresión en una célula hospedante heteróloga u organismo hospedante.

b) puede formar una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción del Nanocuerpo de una célula hospedante en la síntesis. Péptidos líderes secretorios adecuados serán claros a la persona experta, y pueden ser como se describen adicionalmente en este documento. Usualmente, tal secuencia líder estará enlazada al N-término del Nanocuerpo, a pesar que la invención está presente en su más amplio sentido no se limita a este;

c) puede formar una secuencia o señal que permite al Nanocuerpo ser dirigido hacia y/o penetrar o entrar en órganos, tejidos, células o compartimientos específicos de células, y/o que permite al Nanocuerpo penetrar o cruzar una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa celular tal como una capa de células epiteliales, un tumor que incluye tumores sólidos, o la barrera hemato-encefálica. Ejemplos de tales secuencias de aminoácido serán claros para la persona experta. Algunos ejemplos no limitantes son los vectores de péptido pequeño ("vectores Pep-trans") descritos en el documento WO 03/026700 y en

285

Temsamani et al., Expert Opin. Biol. Ther., 1, 773 (2001); Temsamani y Vidal, Drug Discov. Today, 9, 1012 (004) y Rousselle, J. Pharmacol. Exp. Ther., 296, 124-131 (2001), y la secuencia translocadora de membrana descrita por Zhao et al., Apoptosis, 8, 631-637 (2003). Secuencias de aminoácido C-terminal y N-terminal para objetivo intracelular de fragmentos de anticuerpo son por ejemplo, descritos por Cardinales et al., Methods, 34, 171 (2004). Otras técnicas adecuadas para objetivo intracelular involucran la expresión y/o uso de los así llamados "anticuerpos" que comprenden un Nanocuerpo de la invención, como se menciona abajo;

d) puede formar una "etiqueta", por ejemplo una secuencia o residuo de aminoácido que permite o facilita la purificación del Nanocuerpo, por ejemplo, usando técnicas de afinidad dirigidas contra la secuencia o residuo. En adelante, la secuencia o residuo puede ser removido (por ejemplo, por desdoblamiento químico o enzimático) para proporcionar la secuencia de Nanocuerpo (para este propósito, la etiqueta puede opcionalmente estar enlazada a la secuencia de Nanocuerpo vía una secuencia enlazadora desdoblada o contiene una porción desdoblada). Algo preferido, pero ejemplos no limitantes de tales residuos son residuos de histidina múltiple, residuos de glutaniona y una etiqueta myc tal como AAAEQKLISEEDLNGAA [SEC ID NO.

286

476];

e) puede ser uno o más residuos de aminoácido que han sido funcionalizados y/o que pueden servir como un sitio para unión de grupos funcionales. Residuos de aminoácido adecuados y grupos funcionales serán claros a la persona experta e incluye, pero no se limita a, los residuos de aminoácido y grupos funcionales mencionados en este documento por los derivados de los Nanocuerpos de la invención.

De acuerdo a otra modalidad, un polipéptido de la invención comprende un Nanocuerpo de la invención, el cual se fusiona a su extremo amino terminal, a su extremo carboxi terminal, o ambos a su extremo amino terminal y a su extremo carboxi terminal por al menos una secuencia de aminoácido adicional, es decir, para proporcionar una fusión de proteína, que comprende el Nanocuerpo de la invención y a una o más de las secuencias de aminoácido adicional. Tal fusión también será referida en este documento como una "fusión de Nanocuerpo".

Una o más de las secuencias de aminoácido adicional puede ser cualquiera de las secuencias de amino adecuada y/o deseada. Las secuencias de aminoácido adicional pueden o no pueden cambiar, alterar o de otra forma influenciar las propiedades (biológicas) del Nanocuerpo, y puede o no puede agregar funcionalidad

adicional al Nanocuerpo o el polipéptido de la invención. Preferiblemente, la secuencia de aminoácido adicional es de forma tal que confiere una o más propiedades deseadas o funcionalidades al Nanocuerpo o el polipéptido de la invención.

Ejemplos de tales secuencias de aminoácido serán claros a la persona experta, y pueden generalmente comprender todas las secuencias de aminoácido que se usan en fusiones del péptido en base a anticuerpos convencionales y fragmentos del mismo (que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos de dominio único o ScFv'). Se hace referencia por ejemplo a la revisión por Holliger y Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005).

Por ejemplo, tal secuencia de aminoácido puede ser una secuencia de aminoácido que incrementa la vida media, la solubilidad o la absorción, reduce la inmunogenicidad o la toxicidad, elimina o atenúa los efectos colaterales indeseables, y/o confiere otras propiedades ventajosas a y/o reduce las propiedades indeseadas de los polipéptidos de la invención, comparado al Nanocuerpo de la invención per se. Algunos ejemplos no limitantes de tales secuencias de aminoácido son proteínas de suero, tal como albúmina de suero humano (véase por ejemplo, documento WO 00/27435) o moléculas hapténicas (por ejemplo, haptenos que son reconocidos por anticuerpos que

circulan, véase por ejemplo el documento WO 98/22141).

La secuencia de aminoácido adicional puede también proporciona un segundo sitio enlazante, dicho sitio enlazante puede ser dirigido contra cualquier proteína deseada, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítope (que incluye pero no se limita a la misma proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítope contra el cual en Nanocuerpo de la invención se dirige, o una proteína diferente, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítope). Por ejemplo, la secuencia de aminoácido adicional puede proporciona un segundo sitio enlazante que se dirige contra una proteína de suero (tal como, por ejemplo, albúmina de suero humano u otra proteína de suero tal como IgG), para proporcionar vida media incrementada en suero. Se hace referencia por ejemplo, a los documento EP 0 368 684, WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 04/003019 (en los cuales se mencionan varias proteínas de suero), la solicitud internacional por el solicitante titulada "Nanobodies TM contra beta amiloide y polipéptidos que comprenden los mismos para el tratamiento de enfermedades neural degenerativas tal como enfermedad de Alzheimer" (en la cual se mencionan otras proteínas variadas), así como por Harmsen et al., Vaccine, 23 (41); 4926-42.

De acuerdo a otra modalidad, una o más secuencias

de aminoácido adicional pueden comprender una o más partes, fragmentos o dominios de anticuerpos de cadena 4 convencional (y en anticuerpos humanos particulares) y/o de anticuerpos de cadena pesada. Por ejemplo, aunque usualmente menos preferido, un Nanocuerpo de la invención puede estar enlazada a un dominio V_H o V_L (preferiblemente humano) o para un análogo natural o sintético de un dominio V_H o V_L, nuevamente opcionalmente vía una secuencia enlazadora (que incluye pero no se limita a otros anticuerpos de dominio (único), tal como los dAb descritos por Ward et al.).

Al menos un Nanocuerpo también puede ser enlazado a uno o más dominio CH_1, CH_2 y/o CH_3 (preferiblemente humano), opcionalmente vía una secuencia enlazadora. Por ejemplo, un Nanocuerpo enlazado a un dominio CH_1 adecuado, puede por ejemplo, ser usado junto con cadenas ligeras adecuadas, para generar análogos de fragmentos/estructuras de anticuerpo para fragmentos Fab o fragmentos F(ab')2 convencional, pero en el cual uno o (en caso de un fragmento F(ab')2) uno o ambos de los dominios V_H convencional pueden ser reemplazados por un Nanobody de la invención. También, dos Nanocuerpos pueden ser enlazados a un dominio CH3 (opcionalmente vía un enlazador) para proporcionar un constructo con vida media incrementada in vivo.

De acuerdo a una modalidad específica de la invención, uno o más Nanocuerpos de la invención pueden enlazarse a una o más partes, fragmentos o dominios del anticuerpo que confiere una o más funciones efectoras al polipéptido de la invención y/o puede conferir la capacidad para unirse a uno o más receptores Fc. Por ejemplo, para este propósito, y sin ser limitado a esto, una o más secuencias de aminoácido adicional pueden comprender uno o más dominio CH_2 y/o CH_3 de un anticuerpo, tal como de un anticuerpo de cadena pesada (como se describe en este documento) y más preferiblemente de un anticuerpo de cadena 4 humana convencional; y/o puede formar (parte de) y región Fc, por ejemplo de IgG, de IgE o de otro Ig humano. Por ejemplo, el documento WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprende un dominio V_{HH} Camélido o un derivado del mismo humanizado (es decir, un Nanocuerpo), en el cual, el dominio CH_2 y CH_3 Camelidae pueden ser reemplazados por dominio CH_2 y CH_3 humanos, para proporcionar una inmunoglobulina que contiene 2 cadenas pesadas, cada una comprende un Nanocuerpo y dominio CH2 y CH3 (pero no dominio CH1), dicha inmunoglobulina tiene la función efectora proporcionada por los dominios CH2 y CH3 y dicha inmunoglobulina puede funcionar sin la presencia de cualquier cadena ligera. Otras secuencias de aminoácido que puede ser adecuadamente enlazado a los Nanocuerpos de la

invención para proporcionar una función efectora, será claro a la persona experta, y puede ser escogida en las bases de las funciones afectoras deseadas. Se hace referencia por ejemplo a los documentos WO 04/058820, WO 99/42077 y WO 05/017148, así como a la revisión por Hollinger y Hudson, supra. El acoplamiento de un Nanocuerpo de la invención a una porción Fc también se puede conducir a una vida media incrementada, comparada al Nanocuerpo correspondiente de la invención. Para algunas aplicaciones, el uso de una porción Fc y/o de dominios constantes (es decir, dominios CH_2 y/o CH_3) que confiere vida media incrementada sin cualquier función efectora biológicamente significante puede también ser adecuada o aún preferida. Otros constructos adecuados que comprenden uno o más Nanocuerpos y uno o más dominios constantes con vida media incrementada in vivo, será claro para una persona experta, y puede por ejemplo comprender dos Nanocuerpos enlazados a un dominio CH3, opcionalmente vía una secuencia enlazadora. Generalmente, cualquier proteína o derivado de fusión con vida media incrementada preferiblemente tendrá un peso molecular de más de 50 kD, el valor corte de para absorción renal.

Las secuencias de aminoácido adicional también pueden formar una secuencia señal o una secuencia líder que dirige la secreción del Nanocuerpo o el polipéptido de la

invención de una célula hospedante en la síntesis (por ejemplo para proporcionar una pre-, pro- o prepo-forma del polipéptido de la invención, dependiendo de la célula hospedante usada para expresar el polipéptido de la invención).

La secuencia de aminoácido adicional puede también formar una secuencia o señal que permite al Nanocuerpo o polipéptido de la invención para ser dirigido hacia y/o para penetrar o entrar en órganos, tejidos, células o partes o compartimientos específicos de células, y/o que permite al Nanocuerpo o polipéptido de la invención para penetrar o atravesar una barrera biológica, tal como membrana celular, una capa celular tal como una capa de células epiteliales, un tumor que incluye tumores sólidos, o la barrera hemato-encefálica. Ejemplos adecuados de tales secuencias de aminoácido serán claros para una persona experta, y por ejemplo incluye, pero no se limita a, los vectores "Peptrans" mencionados anteriormente, las secuencias descritas por Cardinale et al., y las secuencias de aminoácido y los fragmentos de anticuerpo conocidos per se, que se pueden usar para expresar o producir los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención también llamados "intracuerpos", por ejemplo, como se describe en los documento WO 94/02610, WO 95/22618, US-A-7004940, WO 03/014960, WO 99/07414; WO 05/01690; EP 1 512 696; y en

293

Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004) 163-170, y las referencias adicionales descritas en este documento.

Para algunas aplicaciones, en particular para aquellas aplicaciones en las cuales se pretende eliminar una célula que expresa el objetivo contra el cual los Nanocuerpos de la invención se dirigen (por ejemplo, en el tratamiento de cáncer), o para reducir o disminuir el crecimiento y/o proliferación de tal célula, los Nanocuerpos de la invención pueden también estar enlazados a un Nanocuerpo de la invención, para proporcionar, por ejemplo, un polipéptido citotóxico de la invención, será claro para una persona experta y puede por ejemplo ser encontrado en la técnica anterior citada anteriormente y/o en la descripción adicional en este documento. Un ejemplo es la así llamada tecnología ADEPT™ del documento WO 03/055527.

De acuerdo a una modalidad no limitante, se pueden agregar uno o más residuos de aminoácido a, insertar en y/o sustituir en la secuencia de aminoácido de un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácido específico para unirse a un grupo PEG.

La eficacia de farmacéuticos de proteína

dependiente en su potencia para neutralizar el objetivo, pero también en los farmacocinéticos intrínsecos del potencial del fármaco. Debido a que los riñones generalmente filtran moléculas abajo de 60,000 Daltons (Da), se han enfocado esfuerzos para reducir el espacio libre en el incremento de peso molecular del biofarmacéutico a través de fusiones de proteínas (Syred et al., 1997), glicosilaciones o modificación con polímeros de polietilen glicol, es decir, PEGilación (Lee et al., 1999; Abuchowski et al., 1977; Nucci et al., 1991; Lecolley, et al. Chem Commun, 2004; Tao et al., J Am Chem Soc, 2004; Mantovani et al., 2005). Estos métodos satisfactoriamente prolongan la exposición in vivo del biofarmacéutico.

Alternativamente, la vida media se puede prolongar usando otro agente de pegilación, POLI PEG para conjugar a los Nanocuerpos bivalentes, TNF56 o TNF55. Los POLI PEG son polímeros de forma apanalada con dientes PEG en una estructura metacrílica. Los POLI PEGS pueden variar en longitud de la cadena PEG, en una estructura metacrílica y en el grupo final activo, el cual determina el método de conjugación del POLI PEG para el Nanocuerpo. La conjugación del sitio específico a la cisteína C-terminal presente en los Nanocuerpos se puede lograr a través del grupo final de maleimida activo en el POLI PEG.

La invención también abarca cualquier Nanocuerpo

de la invención y/o polipéptido de la invención que se ha glicosilado en una o más posiciones de aminoácido, usualmente dependiendo del hospedante usando para expresar el Nanocuerpo o polipéptido de la invención (como se describe adicionalmente abajo).

De acuerdo a una modalidad no limitante, uno o más residuos de aminoácido se pueden agregar a, insertar en y/o sustituir en la secuencia de aminoácido de un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácido específico y/o un sitio que puede ser glicosilado por el organismo hospedante usando. Por medio de un ejemplo preferido, pero no limitante, el residuo N en posición 50 con CDR2 de un Nanocuerpo de la invención puede por ejemplo ser reemplazado por un residuo Q, D o S para proporcionar un sitio de glicosilación, por ejemplo, para glicosilación por *Pichia*.

De acuerdo a otra modalidad, un polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácido de un Nanocuerpo, el cual se fusiona en su extremo amino terminal, en su extremo carboxi terminal o ambos en su extremo amino terminal y en su extremo carboxi terminal con al menos una secuencia de aminoácido adicional.

Nuevamente, las secuencias de aminoácido adicional pueden o no pueden cambiar, alterar o de otra

forma influenciar las propiedades (biológicas) del Nanocuerpo y puede o no puede agregar funcionalidad adicional al Nanocuerpo.

Por ejemplo, de acuerdo a una modalidad preferida, pero no limitante, la secuencia de aminoácido adicional puede comprender al menos un Nanocuerpo adicional, para proporcionar un polipéptido de la invención que comprende al menos dos, tal como tres, cuatro o cinco Nanocuerpos, en los cuales los Nanocuerpos pueden opcionalmente ser enlazados vía una o más secuencias enlazadoras (como se define en este documento).

Los polipéptidos de la invención que comprenden dos o más Nanocuerpos también se referirán en este documento como polipéptidos "multivalentes". Por ejemplo un polipéptido "bivalente" de la invención, comprende dos Nanocuerpos, opcionalmente enlazados vía una secuencia enlazadora, mientras un polipéptido "trivalente" de la invención comprende tres Nanocuerpos, opcionalmente enlazado vía dos secuencias enlazadoras; etc.

En un polipéptido multivalente de la invención, los dos o más Nanocuerpos pueden ser los mismos o diferentes. Por ejemplo, los dos o más Nanocuerpos en un polipéptido multivalente de la invención:

- se puede dirigir contra el mismo antígeno, es decir, contra las mismas partes o epítopes del antígeno o

contra dos o más partes o epítopes diferentes del antígeno; y/o;

- se puede dirigir contra los antígenos diferentes;

o una combinación de los mismos.

Así, un polipéptido de la invención, por ejemplo:

- puede comprender dos Nanocuerpos idénticos;

- puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido contra una primera parte o epítope de un antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido contra la misma parte o epítope del antígeno o contra otra parte o epítope del antígeno;

- o puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente del primer antígeno;

mientras un Polipéptido trivalente de la invención, por ejemplo:

- puede comprender tres Nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos contra las partes o epítopes iguales o diferentes del mismo antígeno;

- puede comprender dos Nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos contra las partes o epítopes iguales o diferentes en un primer antígeno y un tercer Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente del primer antígeno; o

198

- puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno, un segundo Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente del primer antígeno, y un tercer Nanocuerpo dirigido contra un tercer antígeno del primero y segundo antígeno, polipéptidos de la invención que contienen al menos dos Nanocuerpos, en el cual al menos un Nanocuerpo se dirige contra un primer antígeno y al menos un Nanocuerpo se dirige contra un segundo antígeno diferente del primer antígeno, también se referirá como Nanocuerpos "multiespecíficos". Así, un Nanocuerpo "biespecífico" es un Nanocuerpo que comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y al menos un Nanocuerpo adicional dirigido contra un segundo antígeno, mientras un Nanocuerpo "triespecífico" es un Nanocuerpo que comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno, al menos un Nanocuerpo adicional dirigido contra un segundo antígeno, y al menos un Nanocuerpo adicional dirigido contra un tercer antígeno; etc.

Por lo tanto, en su forma más simple, un polipéptido biespecífico de la invención es un polipéptido bivalente de la invención (como se define en este documento), que comprende un primer Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno, en el cual dicho primero y segundo Nanocuerpo puede opcionalmente estar enlazado vía

una secuencia enlazadora (como se define en este documento); en donde un polipéptido triespecífico de la invención en su forma más simple es un polipéptido trivalente de la invención (como se define en este documento), que comprende un primer Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno, un segundo Nanocuerpo se dirige contra un segundo antígeno y un tercer Nanocuerpo dirigido contra un tercer antígeno, en el cual el primero, segundo y tercer Nanocuerpo puede opcionalmente estar enlazado vía uno o más, y en particular uno o más en dos secuencias enlazadoras particulares.

Sin embargo, como será claro de la descripción anteriormente, la invención no se limita a esto, en el sentido que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender cualquier número de Nanocuerpos dirigidos contra dos o más antígenos diferentes.

Para polipéptidos multivalente y multiespecífico que contiene uno o más dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a Conrath et al., J. Biol. Chem., vol. 276, 10. 7346-7350, así como al documento EP 0 822 985.

En los polipéptidos de la invención, uno o más Nanocuerpos y uno o más polipéptidos pueden ser directamente enlazados entre sí (como por ejemplo, se describe en el documento WO 99/23221) y/o puedes estar

enlazados entre sí vía uno o más espaciadores o enlazadores adecuados o cualquier combinación de los mismos.

Espaciadores o enlazadores adecuados para uso en polipéptidos multivalentes o multiespecíficos serán claros a una persona experta, y puede generalmente ser cualquier enlazador o espaciador usado en la técnica para enlazar secuencias de aminoácido. Preferiblemente, el enlazador o espaciador es adecuado para uso en proteínas constructo o polipéptidos que se pretenden para uso farmacéutico.

Algunos espaciadores particularmente preferidos incluyen los espaciadores y enlazadores que se usan en la técnica para enlazar fragmentos de anticuerpo o dominios de anticuerpo. Estos incluyen los enlazadores mencionados en el antecedente general de la técnica citado anteriormente, así como por ejemplo, enlazadores que se usan en la técnica para anticuerpos constructo o fragmentos ScFv (en este aspecto, sin embargo, se notará que mientras en anticuerpos y en fragmentos ScFv, la secuencia enlazadora usada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad u otras propiedades que permite a los dominios V_H y V_L pertinentes llegar juntos para formar el sitio enlazante al antígeno completo, no hay limitación particular en la longitud o la flexibilidad del enlazador usado en el polipéptido de la invención, ya que cada Nanocuerpo por si mismo forma un sitio enlazante al antígeno completo).

Otros enlazadores adecuados generalmente comprenden compuestos orgánicos o polímeros, en particular aquellos adecuados para uso en proteínas para uso farmacéutico. Por ejemplo, porciones poli(etilenglicol) se han usado para enlazar dominios de anticuerpo, véase por ejemplo el documento WO 04/081026.

También dentro del alcance de la invención, los enlazadores usados confieren uno o más de otras propiedades favorables o funcionalidad a los polipéptidos de la invención, y/o proporciona uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la unión de grupos funcionales (por ejemplo, como se describe en este documento para los derivados de los Nanocuerpos de la invención). Por ejemplo, enlazadores que contienen uno o más residuos aminoácidos cargados (véase Tabla A-3 anteriormente) puede proporcionar propiedades hidrofílicas mejoradas, mientras enlazadores que forman o contienen epítopes o etiquetas pequeñas se pueden usar para los propósitos de detección, identificación y/o purificación. Nuevamente, en base a la descripción en este documento, la persona experta será capaz para determinar los enlazadores óptimos para uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Finalmente, cuando do o más enlazadores se usan

en los polipéptidos de la invención, estos enlazadores pueden ser el mismo o diferente. Nuevamente, en base a la descripción en este documento, la persona experta será capaz para determinar los enlazadores óptimos para uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Enlazadores para uso en polipéptidos multivalentes y multiespecíficos serán claros a la persona experta, y por ejemplo incluye enlazadores gly-ser, por ejemplo del tipo $(gly_xser_y)_z$, tal como (por ejemplo $(gly_4ser)_3$ o $(gly_3ser_2)_3$, como se describe en el documento WO 99/42077, regiones similares a articulaciones tales como las regiones de articulación de anticuerpos de cadena pesada que se originan naturalmente o secuencias similares. Para otros enlazadores adecuados, también se hace referencia al antecedente general de la técnica citado anteriormente. Algunos enlazadores particularmente preferidos se dan en las SEC ID NOs. 68 y 69.

Enlazadores también pueden proporcionar alguna funcionalidad para el polipéptido multivalente o multiespecífico. Por ejemplo, enlazadores que contienen uno o más residuos de aminoácido cargado (véase Tabla 1 anteriormente) puede proporcionar propiedades hidrofílicas mejoradas, mientras enlazadores que forman o contienen epítopes o etiquetas pequeñas se pueden usar para los

propósitos de detección, identificación y/o purificación.

Como se menciona en este documento, en una proteína o polipéptido de la invención, los Nanocuerpos anti-TNF mencionados en este documento son preferiblemente enlazados en tal forma que la proteína o pilipéptido, en enlace a un trímero THF, es capaz de inhibir o reducir el receptor TNF reticulado que es mediado por el trímero TNF y/o la transducción de señal que es mediada por el receptor reticulado; y/o en tal forma que la proteína o polipéptido es capaz de enlazarse intramolecularmente a al menos dos sitios enlazados al receptor THF en un trímero TNF. Enlazadores adecuados son como se describen en este documento.

Como también se menciona en este documento, si una proteína o polipéptido proporciona enlace intermolecular o enlace extramolecular se pude valorar (al menos inicialmente) por una cromatografía de exclusión de tamaño. Por Cromatografía de Exclusión de Tamaño, los complejos de TNF alfa y anticuerpos pueden ser analizados para determinar el número y la proporción de anticuerpo y moléculas TNF alfa en el complejo. A partir de estos datos, se puede deducir si se originan enlaces inter- o intramoleculares, como se hizo por Santora y colegas (Santora, L.C., et al., Anal Biochem. 2001) para estabiliza la estequiometria de enlace del anticuerpo D2E7 monoclonal

(Humira) para TNF alfa a proporciones diferentes de anticuerpo y etiqueta. A partir del peso molecular del complejo se concluye que tres moléculas de anticuerpo sometidas a complejo con tres trímeros TNF, con ello indicando que los enlaces de anticuerpo en una forma intermolecular. Experimentos similares se realizan con Nanocuerpos bivalentes, en los cuales un enlazador muy corto induce la formación de complejos moleculares grandes, los cuales se obtienen por uniones intermoleculares. Sin embargo, algunos constructos de Nanocuerpos bivalentes con enlazadores más largos eluidos de la columna de filtración en gel como complejos pequeños discretos, con ello se demuestra que se forman las uniones intramoleculares. Combinados con los datos de bioensayo, en los cuales en enlazador más largo que contiene Nanocuerpo TNF1 tiene una potencia óptima (neutralización completa de cantidad de TNF usada en el ensayo, es decir, 10 pM), se puede concluir que en enlace intramolecular del Nanocuerpo bivalente, efectivamente previene la reticulación de dos receptores unidos a la célula y la activación del receptor asociado. Anticuerpos monoclonales conocidos tales como Humira o Remicade pueden no formar tales uniones intramoleculares, que conduce siempre dos sitios de enlace al receptor en la molécula TNF trimérica para un cierto grado disponible para interacción con el receptor unido a la célula, el cual se

traduce en neutralización menos potente como se mide en el bioensayo.

Alternativamente, si una proteína o polipéptido proporciona enlace intermolecular o enlace extramolecular puede ser valorada por cristalografía y/o modelado molecular (u otro adecuado en técnicas de sílice). Un modelo de un complejo TNF30/TNF alfa trimérico se genera en base a la estructura de cristal del complejo TNF1/TNF alfa de tipo nativo, monomérico. Para esta estructura, se modela el constructo enlazador TNF30-enlazador ALB8-TNF30 final. Se modela el constructo enlazador TNF30-enlazador ALB8-TNF30 partiendo del trímero de TNFα con dos moléculas TNF30 unidas. Como la estructura del ALB8 no se conoce, en lugar se usa una tercera molécula TNF30, la cual se coloca entre los otros dos Nanocuerpos a lo largo de la línea, entre el N- y C-termino. Los enlazadores de 9 aminoácidos, después se agregan manualmente.

El modelo se muestra en la Figura 62. Claramente, los enlazadores de 9 aminoácidos junto con la ALB8, proporciona suficiente espacio para abarcar aproximadamente 66 Å entre los dos dominios TNF30 unidos a TNFα. ALB8 por si misma abarca 40 Å, y cada enlazador puede abarcar otro ~27 Å en conformación completamente extendida. Como un resultado, la ALB8 tiene completamente algo de flexibilidad de movimiento, y no se espera que se enlace a albúmina,

puede interferir mucho con en enlace a TNFα.

Sin embargo, es igualmente que los enlazadores pueden ser acortados sin afectar la avidez, especialmente en el caso den enlazador que es C-terminal de ALB8. Esto puede tener el efecto benéfico de incrementar en el enlace al mismo trímero TNFα contra los trímeros reticulados, porque la probabilidad que el segundo TNF30 se asocie con un TNFα diferente incrementa con la longitud del enlazador.

Como también se describe adicionalmente en este documento, un polipéptido multiespecífico de la invención dirigido contra un antígeno deseado y contra al menos una proteína de suero, tal como las proteínas de suero mencionadas posteriormente en este documento, y en particular contra albúmina de suero humano, puede mostrar vida media incrementada en suero, comparado al Nanocuerpo monovalente correspondiente.

Como se menciona en este documento anteriormente, los métodos descritos en este documento son particularmente adecuados para generar tal multivalente de polipéptidos multiespecíficos de la invención.

En un polipéptido de la invención, al menos un Nanocuerpo también puede estar enlazado a un dominio VH convencional o para un análogo natural o sintético de un dominio V_H, opcionalmente vía una secuencia enlazadora.

En un polipéptido de la invención, al menos un

Nanocuerpo puede también estar enlazado a un dominio V_L o para un análogo natural o sintético de un dominio V_L, opcionalmente vía una secuencia enlazadora, para proporcionar un polipéptido de la invención que está en la forma análoga a un fragmento scFv convencional, pero que contiene un Nanocuerpo en lugar de un dominio V_H.

En un polipéptido de la invención, al menos un Nanocuerpo puede también estar enlazado a uno o más de un dominio CH_1, CH_2 y/o CH_3, opcionalmente vía una secuencia enlazadora. Por ejemplo, un Nanocuerpo enlazado a un dominio CH_1 adecuado, puede por ejemplo, ser usado junto con cadenas ligeras adecuadas, para generar análogos de fragmento/estructuras de anticuerpo para fragmentos Fab convencional o fragmentos $F(ab')_2$, pero en el cual uno o (en caso de un fragmento $F(ab')_2$) uno o ambos de los dominios VH convencionales pueden ser reemplazados por un Nanocuerpo. Tales fragmentos también pueden ser heteroespecíficos o biespecíficos, es decir, dirigido contra dos o más antígenos. Un Nanocuerpo enlazado a dominios CH_2 y CH_3 adecuados, por ejemplo derivados de Camélidos, pueden ser usados para formar un anticuerpo de cadena pesada nanoespecífica o biespecífica. Finalmente, un Nanocuerpos enlazado a dominios CH1, CH2 y CH3, por ejemplo derivado de un humano, debe ser usado, junto con cadenas ligeras adecuadas, para formar un anticuerpo que es análogo

a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, pero en el cual uno o ambos de los dominios V_H convencional se han reemplazado por un Nanocuerpo.

También, además a uno o más Nanocuerpos, polipéptidos de la invención pueden también contener grupos, porciones o residuos funcionales, por ejemplo, sustancias terapéuticamente activas, tal como aquellos mencionados posteriormente, y/o marcadores y marcas, tal como marcadores fluorescentes, isotopos, etc., como se describe adicionalmente posteriormente en este documento.

Los Nanocuerpos de la invención, los polipéptidos de la invención, y ácidos nucleicos que codifican el mismo, pueden ser preparados en una manera conocida per se, como será a una persona experta a partir de la descripción adicional en este documento. Algunos métodos preferidos, pero no limitantes para preparar los Nanocuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos incluyen los métodos y técnicas mencionadas anteriormente y/o descritas adicionalmente en este documento posteriormente.

Como será claro a una persona experta, un método particularmente útil para preparar un Nanocuerpo y/o un polipéptido de la invención, generalmente comprende las etapas de:

- la expresión, en una célula hospedante u organismo hospedante adecuado (también referido en este

documento como un "*hospedante de la invención*") o en otro sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifica el Nanocuerpo o polipéptido de la invención (también referido en este documento como un "*ácido nucleico de la invención*"), opcionalmente seguido por:

- aislar y/o purificar el nanocuerpo o polipéptido de la invención, así obtenido.

En particular, tal método puede comprender las etapas de:

- cultivar y/o mantener un hospedante de la invención bajo condiciones que son de tal forma que el hospedante de la invención expresa y/o produce al menos un Nanocuerpo y/o polipéptido de la invención; opcionalmente seguido por:

- aislar y/o purificar el Nanocuerpo o polipéptido de la invención así obtenido.

Un ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de ADN o ARN ramificada única o doble, y es preferiblemente en la forma de ADN de ramificado doble. Por ejemplo, las secuencias del nucleótido de la invención puede ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético (tal como ADN con un codón utilizado que ha sido específicamente adaptado para expresión en la célula hospedante u organismo hospedante planeado).

De acuerdo a una modalidad de la invención, el

ácido nucleico de la invención es esencialmente asilado, como se define en este documento anteriormente.

El ácido nucleico de la invención también está en la forma de, estar presente en y/o ser parte de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido o YAC, el cual nuevamente puede estar en forma esencialmente aislada.

Los ácidos nucleicos de la invención, pueden ser preparados u obtenidos en una manera conocida per se, en base a la información en las secuencias de aminoácido para los polipéptidos de la invención, proporcionados en este documento, y/o pueden ser aislados de una fuente natural adecuada. Para proporcionar análogos, secuencias de nucleótido que codifican dominios V_{HH} que se originan de forma natural, pueden por ejemplo ser sometidos a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifica en análogo. También, será claro a la persona experta, preparar un ácido nucleico de la invención, también varias secuencias de nucleótido, tal como al menos una secuencia de nucleótido que codifica un Nanocuerpo y por ejemplo ácidos nucleicos que codifican uno o más enlazadores, pueden estar enlazados juntos en una manera adecuada.

Técnicas para generar los ácidos nucleicos de la invención, serán claras a la persona experta y puede por ejemplo incluir, pero no se limita a, síntesis de ADN

automatizada; mutagénesis dirigida al sitio; combinar dos o más secuencias sintéticas o que se origina de forma natural (o dos o más partes de la misma), introducción de mutaciones que conduce a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que pueden fácilmente ser digeridos y/o ligados usando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medios de una reacción RCP usando uno o más cebadores "apareados de manera desigual", usando por ejemplo, una secuencia de un GPCR que se origina de forma natural como una plantilla. Estas y otras técnicas serán claras a la persona experta, y nuevamente se hace referencia a los manuales, tal como Sambrook et al., y Ausubel et al., mencionado anteriormente, así como en los Ejemplos de abajo.

El ácido nucleico de la invención puede también estar en la forma de, ser presente en y/o ser parte de un constructo genético, será claro a una persona experta en la técnica. Tales constructos genéticos generalmente comprenden al menos un ácido nucleico de la invención, que es opcionalmente enlazada a uno o más elementos de constructos genéticos conocidos per se, tal como por ejemplo, uno o más elementos reguladores adecuados (tal como promotores, mejoradores, terminadores adecuados, etc.)

y los elementos adicionales de constructos genéticos referidos en este documento anteriormente. Tales constructos genéticos que comprende al menos un ácido nucleico de la invención también serán referidos en este documento como "*constructos genéticos de la invención*".

Los constructos genéticos de la invención pueden ser ADN o ARN, y son preferiblemente ADN ramificados doble. Los constructos genéticos de la invención pueden también estar en la forma adecuada para transformación de la célula hospedante u organismo hospedante planeado, en una forma adecuada para integración en el ADN genómico de la célula hospedante planeada o en una forma de replicación independiente adecuada, mantenido y/o legado en el organismo hospedante planeado. Por ejemplo, los constructos genéticos de la invención pueden estar en la forma de un vector, tal como por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposon. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que puede ser proporcionado para expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula hospedante, organismo hospedante y/o sistema de expresión adecuado).

En una modalidad preferida, pero no limitante, un constructo genético de la invención comprende

a) al menos un ácido nucleico de la invención; operablemente conectado a

b) uno o más elementos reguladores, tal como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado;

c) y opcionalmente también

d) uno o más elementos adicionales de constructos genéticos conocidos per se;

en el cual los términos "elemento regulador", "promotor", "terminador" y "operablemente conectado" tiene su significado usual en la técnica (como se describe adicionalmente abajo); y en la cual dichos "elementos adicionales" presentes en los constructos genéticos pueden por ejemplo ser secuencias 3'- o 5'-URT, secuencias líder, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes reporteros, y/o elementos que pueden facilitar o incrementar (la eficacia de) transformación o integración. Estos y otros elementos adecuados para tales constructos genéticos serán claros a una persona experta, y puede por ejemplo depender del tipo de constructo usado, la célula hospedante u organismo hospedante planeado; la manera en la cual las secuencias del nucleótido de interés, son para ser expresadas (por ejemplo, vía constitutiva, temporal o expresión inducible); y/o la técnica de transformación para ser usada.

Preferiblemente, en los constructos genéticos de la invención, al menos un ácido nucleótido de la invención y los elementos reguladores, y opcionalmente uno o más

elementos adicionales, son "operablemente enlazados" entre sí, por el cual es generalmente representado que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor se considera "operablemente enlazado" a una secuencia codificante, si el promotor es capaz de iniciar o de otra forma controlar/regular las transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en la cual la secuencia codificante debe entenderse por estar "bajo el control de" el promotor). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótido están operablemente enlazadas, pueden estar en la misma orientación y usualmente también en la misma estructura lectora. Usualmente también son esencialmente contiguos, aunque esto puede también no ser requerido.

Preferiblemente, los elementos reguladores y adicionales de los constructos genéticos de la invención son de tal forma que son capaces de proporcionar su función biológica planeada en la célula hospedante u organismo hospedante planeado.

Por ejemplo, un promotor, un intensificador o terminador debe ser "*operable*" en la célula hospedante u organismo hospedante, por el cual se piensa que (por ejemplo) el promotor debe ser capaz de iniciar o de otra forma controlar/regular la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótido, por ejemplo, una secuencia codificante, la cual está operablemente enlazada (como se

define en este documento).

Algunos promotores particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotores conocidos per se para la expresión en células bacterianas, tales como aquellas mencionadas en este documento posteriormente y/o aquellas usadas en los Ejemplos.

Una selección de marcadores debe ser de tal forma que permita, por ejemplo, bajo condiciones de selección apropiadas, células hospedantes y/o organismos hospedantes que se han transformado (exitosamente) con la secuencia de nucleótido de la invención para ser distinguida de las células/organismos hospedantes que no se han transformado (exitosamente). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales marcadores, son genes que proporcionan resistencia contra antibióticos (tales como canamicina o ampicilina), genes que proporcionan resistencia a temperatura, o genes que permiten a la célula hospedante u organismo hospedante ser mantenidos en la ausencia de ciertos factores, compuestos y/o componentes (alimento) en el medio que son esencialmente para supervivencia de las células u organismos no transformados.

Una secuencia líder debe de ser de forma tal que, en la célula hospedante u organismo hospedante planeado, permite las modificaciones post-traduccional deseado y/o de forma tal que dirige el ARNm transcripto a una parte

deseada u organelo de una célula. Una secuencia líder puede también permitir la secreción del producto de expresión de la célula. Como tal, la secuencia líder puede ser pro-, pre- o prepo-secuencia operable en la célula hospedante u organismo hospedante. Las secuencias líderes no pueden ser requeridas para expresión de una célula bacteriana.

Un marcador de expresión o un gen reportero debe de ser de forma tal que en la célula hospedante u organismo hospedante, permita la detección de la expresión de (un gen o secuencia de nucleótido presente en) el constructo genético. Un marcador de expresión puede opcionalmente también permitir la localización del producto expresado, por ejemplo, en una parte específica u organelo de una célula y/o en células, tejidos, órganos o partes específicas de un organismo multicelular. Tales genes reporteros pueden también ser expresados como una fusión de proteína con la secuencia de aminoácido de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes incluyen proteínas fluorescentes tales como GFP.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de promotores, terminadores y elementos adicionales adecuados incluyen aquellos usados en los Ejemplos de abajo. Para algunos ejemplos no limitantes de los promotores, marcadores de selección, secuencias líderes, marcadores de expresión y elementos adicionales que pueden

estar presentes/usados en los constructos genéticos de la invención, tales como terminadores, intensificadores transcripcionales y/o traduccionales, y/o factores de integración, se hace referencia a los manuales generales tal como Sambrook et al., y Ausubel et al., mencionados anteriormente, así como para los ejemplos que se proporcionan en los documentos WO 95/07463, WO 96/23810, WO 95/07463, WO 95/21191, WO 97/11094, WO 97/42320, WO 98/06737, WO 98/21355, US-A-6,207,410, US-A-5,693,492 y EP 1 085 089. Otros ejemplos serán claros a la persona experta. Se hace referencia al antecedente general de la técnica citado anteriormente y las referencias citadas en este documento posteriormente.

Los constructos genéticos de la invención, pueden generalmente ser proporcionados para enlazar adecuadamente las secuencias del nucleótido de la invención a uno o más elementos adicionales descritos anteriormente, por ejemplo usando las técnicas descritas en los manuales generales tales como Sambrook et al., y Ausubel et al., mencionados anteriormente.

A menudo, los constructos genéticos de la invención serán obtenidos insertando una secuencia de nucleótido de la invención en un vector adecuado (expresión) conocido per se. Algunos ejemplos preferidos, no limitantes de vectores de expresión adecuados son

aquellos usados en los Ejemplos posteriores, así como aquellos mencionados debajo.

Los ácidos nucleicos de la invención y/o los constructos genéticos de la invención pueden ser usados para transformar una célula hospedante u organismo hospedante. La célula hospedante u organismo hospedante, puede ser cualquier célula (fúngica, procariótica o eucariótica) o línea celular adecuada o cualquier organismo fúngico, procariótico o eucariótico adecuado, por ejemplo:

- una cepa bacteriana, que incluye pero no se limita a cepas gram negativo, tal como cepas de *Escherichia coli*; de *Proteus*, por ejemplo de *Proteus mirabilis*; de *Pseudomonas*, por ejemplo de *Pseudomonas fluorescens*; y cepas gram positivas tales como cepas de *Bacillus*, por ejemplo de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por ejemplo de *Streptomyces lividans*; de *Staphylococcus*, por ejemplo de *Staphylococcus carnosus*; y de *Lactococcus*, por ejemplo de *Lactococcus lactis*;

- una célula fúngica, que incluye pero no se limita a células de especies de *Trichoderma*, por ejemplo de *Trichoderma reesei*; de *Neurospora*, por ejemplo de *Neurospora crassa*; de *Sordaria*, por ejemplo de *Sordaria macrospora*; de *Aspergillus*, por ejemplo de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus sojae*; o de otros hongos filamentosos;

- una célula de levadura, que incluye pero no se limita a células de especies de *Saccharomyces*, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*; de *Schizosaccharomyces*, por ejemplo de *Schizosaccharomyces pombe*; de *Pichia*, por ejemplo de *Pichia pastoris* o de *Pichia methanolica*; de *Hansenula*, por ejemplo de *Hansenula polymorpha*; de *Kluyveromyces*, por ejemplo de *Kluyveromyces lactis*; de *Arxula*, por ejemplo de *Arxula adeninivorans*; de *Yarrowia*, por ejemplo de *Yarraowia lipolytica*;

- una célula anfibiana o línea celular, tal como *Xenopus oocytes*;

- una célula o línea celular derivada de insecto, tal como células/líneas celulares derivadas de lepidóptera, que incluyen pero no se limita a células SF9 y Sf21 de *Spodoptera* o células/líneas celulares derivadas de *Drosophila*, tal como células de Schneider y Kc;

- una planta o célula de planta, por ejemplo en plantas de tabaco; y/o

- una célula o línea celular de mamífero, por ejemplo derivado de una célula o línea celular derivada de un humano; a partir de mamíferos que incluyen pero no se limitan a células CHO, células BHK (por ejemplo células BHK-21) y células o líneas celulares humanas como HeLa, COS (por ejemplo COS-7) y células PER.C6;

así como otros hospedantes o células hospedantes conocidas

per se, para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (que incluyen, pero no se limita a anticuerpos de dominio (único) y fragmentos ScFv), los cuales serán claros a la persona experta. También se hace referencia al antecedente general de la técnica citado en este documento anteriormente, así como por ejemplo en el documento WO 94/29457; documento WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken et al., (1998), supra; Riechmann y Muyldermans, (1999), suptra; van der Linden, (2000), suptra; Thomassen et al., (2002), suptra; Joosten et al., (2003), supra; Joosten et al., (2005), suptra; y las referencias adicionales citadas en este documento.

Los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, pueden también ser introducidos y expresados en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo, para propósitos profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como una terapia de gen). Para este propósito, las secuencias de nucléotido de la invención pueden ser introducidas en las células o tejidos, en cualquier forma adecuada, por ejemplo tal como (por ejemplo, usando liposomas) o después que se han insertado en un vector de terapia de gen adecuado (por ejemplo, derivado de retrovirus tal como adenovirus, o parvovirus tal como virus adeno-asociado). También será claro a la persona experta, tal terapia de gen puede ser realizada *in*

vivo y/o *in situ* en el cuerpo de un paciente, administrando un ácido nucleico de la invención o un vector de terapia de gen adecuada, que codifica lo mismo al paciente o a células específicas o, un tejido u órgano específico del paciente; o células adecuadas (a menudo tomadas del cuerpo del paciente a ser tratado, tal como linfocitos colocados en medio de cultivo, aspirados de médula ósea o biopsias de tejido) pueden ser tratados en el cuerpo del paciente. Todos esto puede ser realizado usando vectores, técnicas y sistemas de suministro de terapia de gen, los cuales son bien conocidos por la persona experta, por ejemplo Culver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, N.Y.; Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91; (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, US 5,580,859, US 505895466; o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Por ejemplo, expresión in situ de fragmentos ScFv (Afanasieva et al., Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) y de diacuerpos (Blanco et al., J.

322

Immunol, 171, 1070-1077 (2003)) se han descrito en la técnica.

Para expresión de los Nanocuerpos en una célula, pueden ser también expresados o denominados como "intracuerpos", como por ejemplo se describen en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618 y US-A-7004940; WO 03/014960; en Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.

Para producción, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, pueden por ejemplo también ser producidos en la leche de mamíferos transgénicos, por ejemplo, en la leche de conejos, vacas, gatos u ovejas (véase por ejemplo, los documentos US-A-6,741,957, US-A-6,304,489 y US-A-6,849,992 para generar técnicas para introducir transgenes en mamíferos), en plantas o partes de plantas, que incluyen pero no se limita a sus hojas, flores, frutos, semillas, raíces o tubérculos (por ejemplo, en tabaco, maíz, fríjol de soya o alfalfa) o en por ejemplo, pupa del gusano de seda *Bombyx mori*.

Además, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, pueden también ser expresados y/o ser producidos en sistemas de expresión de célula libre, y ejemplos adecuados de tales sistemas serán claros a la persona

experta. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes incluyen expresión en el sistema de germen de trigo; en lisados reticulocito de conejo; o en el sistema Zubay de *E. coli*.

Como se menciona anteriormente, una de las ventajas del uno de Nanocuerpos es que los polipéptidos en base al respecto, pueden ser preparados a través de la expresión en un sistema bacteriano adecuado, y sistemas de expresión bacteriana adecuada, vectores, células hospedantes, elementos reguladores, etc., será claro a la persona experta, por ejemplo a partir de las referencias citadas anteriormente. Se notará sin embargo que la invención en su sentido más amplio no se limita a expresión en sistemas bacteriana.

Preferiblemente, en la invención, un sistema de expresión (in vivo o in vitro), tal como un sistema de expresión bacteriano, se usa para proporcionar los polipéptidos de la invención en una forma que es adecuada para uso farmacéutico, y tales sistemas de expresión nuevamente serán claros a la persona experta. También será claro a la persona experta, se pueden preparar polipéptidos de la invención adecuados para uso farmacéutico usando técnicas para síntesis de péptido.

Para producción en escala industrial, hospedantes heterólogos preferidos para la producción (industrial) de

Nanocuerpos o Nanocuerpo que contiene terapéuticos de proteína incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*, que son adecuados para expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para expresión/producción/fermentación farmacéutica a gran escala. Ejemplos adecuados de tales cepas serán claros a la persona experta. Tales cepas y sistemas de producción/expresión también están disponibles por compañías tal como Biovitrum (Uppsala, Suecia).

Alternativamente, líneas celulares de mamífero, en particular células de ovario (CHO) de hámster Chino pueden ser usadas para expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para expresión/producción/fermentación farmacéutica a gran escala. Nuevamente, tales sistemas de expresión/producción también están disponibles por algunas de las compañías mencionadas anteriormente.

La selección del sistema de expresión específico dependerá en parte en el requerimiento para ciertas modificaciones post-traduccional, más específicamente glicosilación. La producción de un Nanocuerpo que contiene proteína recombinante para la cual la glicosilación deseada o requerida necesitará el uso de hospedante de expresión en mamífero, que tiene la capacidad para glicosilar la proteína expresada. En este respecto, será claro a la

persona experta que el patrón de glicosilación obtenido (es decir, la clase, número y posición de residuos unidos) dependerá en la célula o línea celular que se usa para la expresión. Preferiblemente, ya sea una célula humana o línea celular usada (es decir, que conduce a una proteína que esencialmente tiene un patrón de glicosilación humano) o se usa otra línea celular de mamífero que puede proporcionar un patrón de glicosilación que es esencialmente y/o funcionalmente el mismo como glicosilación humana o al menos glicosilación humana imitadora. Generalmente, los hospedantes procarióticos tal como *E. coli* no tienen la capacidad para glicosilar proteínas, y el uso de eucariotas inferiores tal como levadura, son usualmente conducidos a patrón de glicosilación que difiere de glicosilación humana. Sin embargo, se entenderá que todas las células hospedantes extrañas y sistemas de expresión se pueden usar en la invención, dependiendo del Nanocuerpo o proteína deseada a ser obtenida.

Así, de conformidad a una modalidad no limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido de la invención es glicosilado. De acuerdo a otra modalidad no limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido de la invención no es glicosilado.

De acuerdo a una modalidad preferida, no

limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula bacteriana, en particular una célula bacteriana adecuada para producción farmacéutica a gran escala, tales células de las cepas mencionadas anteriormente.

De acuerdo a otra modalidad preferida, no limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula de levadura, en particular una célula de levadura adecuada para producción farmacéutica a gran escala, tal como células de las especies mencionadas anteriormente.

De acuerdo a aún otra modalidad preferida, pero no limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula de mamífero, en particular en una célula humana o en una línea celular humana, y más en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana que es adecuada para producción farmacéutica a gran escala, tal como las líneas celulares mencionadas anteriormente.

Cuando la expresión en una célula hospedante se usa para producir los Nanocuerpos y las proteínas de la invención, los Nanocuerpos y proteínas de la invención pueden ser producidos ya sea intracelularmente (por ejemplo, en el cistol, en el plasma o en cuerpos de inclusión) y después aislado a partir de las células

hospedantes y opcionalmente purificados adicionalmente; o puede ser producido extracelularmente (por ejemplo, en el medio en el cual las células hospedantes se cultivan) y después aislado a partir del medio de cultivo y opcionalmente purificado adicionalmente. Cuando se usan células hospedantes eucarióticas, la producción extracelular es usualmente preferida ya que esta considerablemente facilita el aislamiento adicional y proceso de corriente abajo de los Nanocuerpos y proteínas obtenidas. Células bacterianas tales como las cepas de *E. coli* mencionada anteriormente normalmente no secretan proteínas extracelular, excepto por unas pocas clases de proteínas tal como toxinas y hemolisina, y producción secretoria en *E. coli* se refiere a la translocación de proteínas a través de la membrana interior para el espacio periplásmico. La producción de periplásmico proporciona varias ventajas sobre la producción citosólica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácido N-terminal del producto secretado, puede ser idéntico al producto del gen natural después de desdoblar la secuencia de señal de secreción por una peptidasa de señal específico. También, parece tener mucha menos actividad de proteasa en el periplasma que en el citoplasma. Además, la purificación de proteína es simple debido a pocas proteínas que contaminan en el periplasma. Otra ventaja es que uniones de disulfuro

correctas pueden ser formadas debido al periplasma, proporciona un ambiente más oxidativo que el citoplasma. Las proteínas expresadas en *E. coli* son a menudo expresadas en agregados insolubles, así llamados cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión pueden ser localizados en el cistol o en el periplasma; la recuperación de proteínas biológicamente activas a partir de estos cuerpos de inclusión requiere un proceso de desnaturalización/repliegue. Muchas proteínas recombinantes, que incluyen proteínas terapéuticas, se recuperan a partir de cuerpos de inclusión. Alternativamente, será claro a una persona experta, que las cepas recombinantes de bacteria que se han modificado genéticamente para secretar una proteína deseada, y en particular se puede usar un Nanocuerpo o un polipéptido de la invención.

Así, de acuerdo a una modalidad no limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido de la invención es un Nanocuerpo o polipéptido que se han producido intracelularmente y que se han aislado de la célula hospedante, y en particular de una célula bacteriana o de un cuerpo de inclusión en una célula bacteriana. De acuerdo a otra modalidad no limitante de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención es un Nanocuerpo o polipéptido que se ha producido extracelularmente, y que se

ha aislado del medio el cual se cultiva la célula hospedante.

Algunos promotores preferidos, no limitantes para uso con estas células hospedantes incluyen,

- para expresión en *E. coli*: promotor lac (y derivados de los mismos, tal como el promotor lacUV5); promotor arabinosa; promotor hacia la izquierda- (PL) y hacia la derecha (PR) del fago lambda; promotor del operon trp; promotores lac/trp híbridos (tac y trc); promotor T7 (más específicamente del gen 10 de fago T7) y otros promotores de fago T; promotor del gen resistente de tetraciclina Tn10; variantes diseñados por ingeniería de los promotores anteriores que incluyen una o más copias de una secuencia operadora reguladora superflua;

- para expresión en S. cerevisiae: constitutivo: ADH1 (deshidrogenasa de alcohol 1), ENO (enolasa), CYC1 (citocromo c iso-1), GAPDH (deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato); PGK1 (fosfoglicerato cinasa), PYK1 (piruvato cinasa); regulado: GAL1,10,7 (enzimas metabólicas de galactosa), ADH2 (deshidrogenasa de alcohol 2), PHO5 (fosfatasa de ácido), CUP1 (metalotioneina de cobre); heterólogos: CaMV (promotor 35S del virus de mosaico de coliflor);

- para expresión en *Pichia pastoris*: el promotor AOX1 (oxidasa de alcohol I)

330

- para expresión en células de mamífero: intensificador/promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano (hCMV); variante del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (hCMV) que contiene dos secuencias operadoras de tetraciclina, de forma tal que el promotor puede ser regulado por el represor Tet; promotor de timidina cinasa (TK) del Virus de Herpes Simple; intensificador/promotor de terminal repetida largo (RSV LTR) del Virus de Sarcoma Rous; promotor del factor 1α de alargamiento (heF-1α) a partir de humano, chimpancé, ratón o rata; el promotor temprano SV40; promotor de terminal repetida larga HIV-1; promotor β-actina;

Algunos vectores preferidos, pero no limitantes para uso con estas células hospedantes incluyen:

- vectores para expresión en células de mamífero: pMAMneo (Clontech), pcADN3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC37199), pRSVneo (ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565), así como sistemas de expresión en base a virus, tal como aquellos en base a adenovirus;

- vectores para expresión en células bacterianas: vectores pET (Novagen) y vectores pQE (Qiagen);

- vectores para expresión en levadura u otras células fúngicas: pYES2 (Invitrogen) y vectores de expresión en *Pichia* (Invitrogen);

- vectores para expresión en células de insecto: pBlueBacII (Invitrogen) y otros vectores de baculovirus;

- vectores para expresión en plantas o células de planta: por ejemplo vectores en base a virus del mosaico de coliflor o virus del mosaico de tabaco, cepas adecuadas de *Agrobacterium*, o vectores en base a plásmido Ti.

También secuencias secretorias preferidos, pero no limitantes para uso con estas células hospedantes incluyen:

- para uso en células bacterianas tales como *E. coli*: PelB, Bla, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, StII, PhoA, PhoE, MalE, Lpp, LamB y similares; péptido de señal TAT, señal secretoria C-terminal de hemolisina;

- para uso en levadura: prepo-secuencia de factor α-apareamiento, fosfatasa (pho1), invertasa (Suc), etc.;

- para uso en células de mamífero: señal indígena en caso de la proteína objetivo es de origen eucariótico; péptido de señal V-J2-C cadena κ murina Ig; etc.

Técnicas adecuadas para transformar un hospedante o célula hospedante de la invención será claro a una persona experta y puede depender en el organismo célula hospedante/hospedante planeado y el constructo genético a

ser usado. Nuevamente se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente.

Después de la transformación, se puede realizar una etapa para detectar y seleccionar aquellas células hospedantes u organismos hospedantes que han sido exitosamente transformados con la secuencia de nucleótido/constructo genético de la invención. Esto puede por ejemplo ser una etapa de selección en base a marcadores seleccionables presentes en el constructo genético de la invención o una etapa que involucra la detección de la secuencia de aminoácido de la invención, por ejemplo, usando anticuerpos específicos.

La célula hospedante transformada (la cual puede estar en forma de una línea celular estable) u organismos hospedantes (los cuales puede estar en la forma de una línea o cepa mutante adecuada) forman aspectos adicionales de la presente invención.

Preferiblemente, estas células hospedantes u organismos hospedantes son de tal forma que expresan, o son capaces (al menos) de expresar (por ejemplo, bajo condiciones adecuados), una secuencia de aminoácido de la invención (y en caso de un organismo hospedante: en al menos una célula, tejido u órgano del mismo). La invención también incluye generaciones, progenie y/o descendencia adicional de la célula hospedante u organismo hospedante de

la invención, que puede por ejemplo ser obtenido por división celular o por reproducción sexual o asexual.

Para producir/obtener expresión de las secuencias de aminoácido de la invención, la célula hospedante transformada u organismo hospedante transformado puede generalmente ser conservado, mantenido y/o cultivado bajo condiciones de forma tal que la secuencia de aminoácido (deseada) de la invención es expresada/producida. Serán claras condiciones adecuadas a la persona experta y usualmente dependerá de la célula hospedante/organismo hospedante usado, así como en los elementos reguladores del control de expresión de la secuencia de nucleótido (relevante) de la invención. Nuevamente, se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionadas anteriormente en los párrafos en los constructos genéticos de la invención.

Generalmente, condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o nutrientes adecuada, el uso de una temperatura adecuada, y opcionalmente la presencia de un factor o compuesto de inducción adecuado (por ejemplo, cuando las secuencias del nucléotido de la invención están bajo el control de un promotor inducible); todos los cuales pueden ser seleccionados por la persona experta. Nuevamente, bajo tales condiciones, las secuencias

de aminoácido de la invención pueden ser expresadas en una manera constitutiva, en una manera temporal, o únicamente cuando es adecuadamente inducido.

También será claro a una persona experta que la secuencia de aminoácido de la invención, puede (primero) ser generado en una forma inmadura (como se menciona anteriormente), la cual después se somete a modificación post-traduccional, dependiendo de la célula hospedante/organismo hospedante usado. También, la secuencia de aminoácido de la invención puede ser glicosilado, nuevamente dependiendo de la célula hospedante/organismo hospedante usado.

La secuencia de aminoácido de la invención, puede después ser aislada de la célula hospedante/organismo hospedante y/o del medio en cual la célula hospedante u organismo hospedante se cultiva, usando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteína conocidas per se, tal como técnicas de cromatografía (preparativa) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo, usando una secuencia de aminoácido desdoblado, específico fusionado con la secuencia de aminoácido de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir, usando anticuerpos contra la secuencia de aminoácido a ser aislado).

Generalmente, para uso farmacéutico, los

polipéptidos de la invención pueden ser formulados como una preparación farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Por medio de ejemplos no limitantes, tal como una formulación puede estar en una forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica, para administración por inhalación, por un parche de piel, por un implante, por un supositorio, etc. Tales formas de administración adecuadas, las cuales pueden ser sólidas, semi-sólidas o líquidas, dependiendo de la forma de administración, así como métodos y portadores para uso en la preparación del mismo será claro a una persona experta, y se describen adicionalmente en este documento posteriormente.

Generalmente, los Nanocuerpo y polipéptidos de la invención pueden ser formulados y administrados en una manera adecuada conocida per se, para lo cual se hace referencia por ejemplo al antecedente general de la técnica citado anteriormente (y en particular a los documentos WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865 y WO 04/041867) así

como a los manuales estándar, tal como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ava Edición, Mack Publishing Company, USA (1990) o Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21ava Edición, Lippincott William and Wilkins (2005).

Por ejemplo, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden ser formulados y administrados en una manera conocida per se, para anticuerpos convencionales y fragmentos de anticuerpo (que incluyen ScFv's y diacuerpos) y otras proteínas farmacéuticamente activas. Tales formulaciones y métodos para preparar la misma, será claro a una persona experta, y por ejemplo incluye preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intra-arterial o intratecal) o para administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

Las preparaciones para administración parenteral pueden por ejemplo ser soluciones estériles, suspensiones, dispersiones o emulsiones que son adecuadas para infusión o inyección. Portadores o diluyentes adecuados para tales preparaciones por ejemplo incluyen, sin limitación, agua estéril y amortiguadores acuosos y soluciones tales como salina amortiguada de fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución dextrosa y solución de Hank; aceites

acuoso; etanol; glicoles tales como propilen glicol o así como aceites minerales, aceites de animal y aceites vegetales, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de fríjol de soya, así como mezclas adecuadas de los mismos. Usualmente, se pueden preferir soluciones o suspensiones acuosas.

Los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, también pueden ser administrados usando métodos de suministro de terapia de gen. Véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,399,346, la cual se incorpora por referencia en su totalidad. Usando un método de suministro de terapia de gen, células primarias transfectadas con el gen que codifica un Nanocuerpo o polipéptido de la invención pueden adicionalmente ser transfectadas con promotores específicos del tejido para órganos específicos objetivo, tejido, injertos, tumores o células, y pueden adicionalmente ser transfectadas con secuencias señal y de estabilización para expresión subcelularmente localizadas.

Así, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden ser sistemáticamente administrados, por ejemplo, oralmente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Pueden estar juntos en cápsulas de gelatina de cubierta suave o dura, pueden ser

comprimidos en tabletas, o pueden ser incorporados directamente con el alimento en la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden ser combinados con uno o más excipientes y usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 0.1% del Nanocuerpo o polipéptido de la invención. El porcentaje de las composiciones y preparaciones pueden, por supuesto, ser variados y pueden convenientemente ser entre aproximadamente 2 hasta aproximadamente 60% del peso de una forma de dosificación unitaria proporcionada. La cantidad del Nanocuerpo o polipéptido de la invención en tales composiciones terapéuticamente útiles es de forma tal que se obtiene un nivel de dosificación efectivo.

Las tableas, trociscos, píldoras, cápsulas y similares, pueden también contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicalcio; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructuosa, lactosa o aspartame o se puede agregar un agente saborizante tal como menta, aceite de

gaulteria, o saborizante a cereza. Cuando una forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además a materiales del tipo anterior, un líquido portador, tal como un aceite vegetal o un polietilen glicol. Otros materiales variados pueden estar presentes como revestimientos o para de otra forma modificar la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, tabletas, píldoras o cápsulas pueden ser revestidos con gelatina, cera, laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, sacarosa o fructuosa como un agente edulcorante, metilo y propilparabenos como preservativos, un tinte y saborizantes tales como sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden ser incorporados en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

También se pueden proporcionar preparaciones y formulaciones para administración oral con un revestimiento entérico que permitirá a los constructos de la invención resistir el ambiente gástrico y pasa a los intestinos. Más generalmente, las preparaciones y formulaciones para administración oral pueden ser adecuadamente formuladas

para suministro en cualquier parte deseada del tracto gastrointestinal. Además, se puede usar supositorios adecuados para suministro en el tracto gastrointestinal.

Los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden también ser administrados intravenosamente o intraperitonealmente por infusión o inyección. Las soluciones de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezclado con un tensoactivo no tóxico. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilen glicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacena y uso, estas preparaciones contienen un preservativo para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo, los cuales están adaptados para la preparación extemporánea de inyectables estériles o, soluciones o dispersiones infundibles, opcionalmente encapsulados en liposomas. En todos los casos, la última forma de dosificación puede ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de manufactura y almacenaje. El portador o vehículo líquido

puede ser un solvente o un medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol un poliol (por ejemplo, glicerol, propileno, glicol, polietilen glicoles líquidos y similares), aceites vegetales, gliceril éteres no tóxicos y mezclas de los mismos adecuadas. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o por el uso de tensoactivos. La prevención de acción de microorganismos puede ser iniciar aproximadamente por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, amortiguadores o cloruro de sodio. Se puede iniciar la absorción prolongada de las composiciones inyectables aproximadamente por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguido por esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los

métodos preferidos de preparación son secado a vacío y técnicas de liofilizado, las cuales proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones filtradas, previamente esterilizadas.

Para administración tópica, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden ser aplicadas en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, será generalmente deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, el cual puede ser un sólido o un líquido.

Portadores sólidos útiles incluyen, sólidos finalmente divididos tal como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxialquilo o glicoles, o mezclas de agua-alcohol/glicol, en las cuales los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden ser disueltos o dispersados en niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensoactivos no tóxicos. Se pueden agregar adyuvantes tal como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso proporcionado. Las composiciones líquidas resultantes pueden ser aplicadas de almohadillas absorbentes, usadas para impregnar vendajes y otras preparaciones de vendaje, o

rociadas en el área afectada usando rociadores en aerosol o tipo bomba.

También se pueden emplear espesantes tales como polímeros, ácidos grasos, sales de ácidos grasos y ésteres, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con portadores líquidos para formar pastas que se puede esparcir, geles, ungüentos, jabones y similares, para aplicación directamente a la piel del usuario.

Se conocen en la técnica ejemplos de composiciones dermatológicas útiles, las cuales se pueden usar para suministrar los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención a la piel; por ejemplo, véase Jacquet et al., (Patente Estadounidense No. 4,608,392), Geria (Patente Estadounidense No. 4,992,478), Smith et al. (Patente Estadounidense No. 4,559,157) y Wortzman (Patente Estadounidense No. 4,820,508).

Dosificaciones útiles de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden determinar comparando su actividad *in vitro*, y actividad *in vivo* en modelos de animal. Se conocen métodos para la explotación de dosificaciones efectivas en ratones y otros animales, a humanos; por ejemplo, véase Patente Estadounidense No. 4,938,949.

Generalmente, la concentración de los Nanocuerpos

y polipéptidos de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será en la forma de aproximadamente 0.1-25 % en peso, preferiblemente aproximadamente 0.5-10% en peso. La concentración en una composición sólida o semi-sólida tal como un gel o un polvo será aproximadamente 0.1-5% en peso, preferiblemente 0.5-2.5% en peso.

La cantidad de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención requerida para uso en tratamiento, variará no únicamente con el Nanocuerpo o polipéptido particular seleccionado, pero también con la ruta de administración, la naturaleza de la condición a ser tratada y, la edad y condición del paciente y será en última instancia en la discreción del especialista o médico tratante. También la dosificación de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención varia dependiendo de la célula objetivo, tumor, tejido, injerto u órgano.

La dosis deseada puede convenientemente ser presentada en una dosis única o como dosis dividida administrada a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más sub-dosis por día. La misma sub-dosis puede ser además dividida, por ejemplo, en un número de administraciones espaciadas con holgura discreta; tal como inhalaciones múltiples de un insuflador o por aplicación de una pluralidad de gotas al ojo.

Un régimen de administración puede incluir

tratamiento diario, prolongado. Por "prolongado" significa al menos dos semanas y preferiblemente, varias semanas, meses o años de duración. Se pueden determinar modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación por un experto ordinario en la técnica, usando únicamente experimentación de rutina que proporciona las enseñanzas en este documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también se puede ajustar por el especialista individual en el evento de cualquier complicación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno relacionado a TNF como se menciona en este documento, el método comprende administrar, a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

En el contexto de la presente invención, el término "prevención y/o tratamiento" no únicamente comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, pero también generalmente comprende prevenir el ataque de la enfermedad, disminuir o invertir el progreso de la enfermedad, prevenir o disminuir el ataque de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir y/o aliviar uno o más síntomas

asociados con la enfermedad, reducir la severidad y/o la duración de la enfermedad y/o de cualquiera de los síntomas asociados con esta y/o prevenir un incremento adicional en la severidad de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con esta, prevenir, reducir o invertir cualquier lesión fisiológica causada por la enfermedad, y generalmente cualquier acción que es benéfica para el paciente a ser tratado.

El sujeto a ser tratado puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más en particular es un humano. Como será claro a la persona experta, el sujeto a ser tratado será en particular una persona que sufre de, o está en riesgo de, las enfermedades o trastornos mencionados en este documento.

La invención también se refiere a un método para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede ser prevenida y/o tratada administrando un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a un paciente, el método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o una composición farmacéutica que comprende el mismo.

Más en particular, la invención se refiere a un

método para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno escogido de un grupo que consiste de las enfermedades o trastornos listados en este documento, el método comprende administrar, a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

En otra modalidad, la invención se refiere a un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, dicho método comprende administrar, a un sujeto que sufre de o está en riesgo de las enfermedades y trastornos mencionados en este documento, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

En los métodos anteriores, los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprende el mismo, puede ser administrada en cualquier manera adecuada, dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica a ser usada. Así, los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden el mismo, pueden por ejemplo ser administradas oralmente, intraperitonealmente (por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente,

intramuscularmente, o vía cualquier otra ruta de administración que evita el tracto gastrointestinal), intranasalmente, transdérmicamente, tópicamente, por medio de un supositorio, por inhalación, nuevamente dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica a ser usada. El médico será capaz de seleccionar una ruta adecuada de administración y una formulación o composición farmacéutica adecuada a ser usada en tal administración, dependiendo de la enfermedad o trastorno a ser prevenido o tratado y otros factores bien conocidos por el médico.

Los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos, son administradas de conformidad a un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno a ser prevenido o tratado. El médico generalmente será capaz para determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o trastorno a ser prevenidos o tratados, la severidad de la enfermedad a ser tratada y/o la severidad de los mismos síntomas, el Nanocuerpo o polipéptido específico de la invención a ser usada, la ruta específica de administración y formulación o composición farmacéutica a ser usada, la edad, sexo, peso, dieta, condición general del paciente, y factores similares bien conocidos por el médico.

Generalmente, el régimen de tratamiento

comprenderá la administración de uno o más Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención, o de una o más composiciones que comprende el mismo, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente efectiva. Las cantidades o dosis específicas a ser administradas se pueden determinar por el médico, nuevamente en base a los factores citados anteriormente.

Generalmente, para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en este documento y dependiendo de la enfermedad o trastorno específico a ser tratado, la potencia del Nanocuerpo y polipéptido específico de la invención a ser usada, la ruta específica de administración y la formulación o composición farmacéutica específica usada, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención generalmente serán administrados en una cantidad entre 1 gramo y 0.01 microgramo por kg de peso corporal por día, preferiblemente entre 0.1 gramo y 0.1 microgramo por kg de peso corporal por día, tal como aproximadamente 1, 10, 100 ó 1000 microgramos por kg de peso corporal por día, ya sea continuamente (por ejemplo, infusión), como una dosis diaria única o como múltiples dosis divididas durante el día. El médico generalmente será capaz para determinar una dosis diaria adecuada, dependiendo de los factores mencionados en este documento. También será claro que en

casos específicos, el médico puede escoger para desviarse de estas cantidades, por ejemplo en las bases de los factores citados anteriormente y su juicio experto. Generalmente, algo de orientación en las cantidades a ser administradas se puede obtener de las cantidades usualmente administradas para anticuerpos o fragmento de anticuerpo convencionales comparables contra el mismo objetivo administrado vía esencialmente la misma ruta, tomando en cuenta sin embargo diferencias en afinidad/avidez, eficacia, biodistribución, vida media y factores similares bien conocidos por la persona experta.

Usualmente, en el método anterior, se usará un Nanocuerpo o polipéptido único de la invención. Sin embargo dentro del alcance de la invención se usas dos o más Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención en combinación.

Los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención también se pueden usar en combinación con uno o más compuestos o principio farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como un régimen de tratamiento combinado, el cual puede o no puede conducir a un efecto sinergístico. Nuevamente, el médico será capaz de seleccionar tales compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, en base a los factores citados anteriormente y su juicio experto.

En particular, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se puede usar en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos o se pueden usar para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades y trastornos citados en este documento, como un resultado del cual se puede o no se puede obtener un efecto sinergístico. Ejemplos de tales compuestos y principios, así como rutas, métodos y formulaciones o composiciones farmacéuticas para administrarlos, después será claro al médico.

Cuando dos o más sustancias o principios se usan como parte de un régimen de tratamiento combinado, se pueden administrar vía la misma ruta de administración o vía diferentes rutas de administración, en esencialmente el mismo tiempo o en tiempos diferentes (por ejemplo, esencialmente de forma simultánea, consecutivamente o de conformidad a un régimen alternativo). Cuando las sustancias o principios se administran simultáneamente vía la misma ruta de administración, se pueden administrar como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes, o parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, será claro a una persona experta.

También, cuando dos o más sustancias o principios activos se usan como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios se

pueden administrar en la misma cantidad y de conformidad con el mismo régimen como se usa cuando el compuesto o principio se usa en sí mismo, y tal combinación usada puede o no puede conducir a un efecto sinergístico. Sin embargo, cuando se usa lo combinado de dos o más sustancias o principios activos conducen a un efecto sinergístico, puede también ser posible reducir la cantidad de una, más o todas las sustancias o principios a ser administrados, mientras se logra la acción terapéutica deseada. Esto puede por ejemplo se usado para evitar, limitar o reducir cualquiera de los efectos colaterales no deseados que están asociados con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades usuales, mientras se obtiene el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

La efectividad del régimen de tratamiento usado de conformidad con la invención, puede ser determinado y/o seguido por cualquier manera conocida per se para la enfermedad o trastorno involucrado, será claro para el médico. El médico también podrá, en caso de ser apropiado y según cada caso individual, cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir los efectos colaterales no deseados, y/o para lograr un balance apropiado entre lograr el efecto terapéutico deseado por una parte y evitar, limitar o reducir los efectos

colaterales no deseados por otra parte.

Generalmente, el régimen de tratamiento será seguido hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o tan largo como el efecto terapéutico deseado se mantenga. Nuevamente, esto se puede determinar por el médico.

Así, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un Nanocuerpo de la invención o al menos un polipéptido de la invención, y al menos un portador adecuado (es decir, un portador adecuado para uso veterinario), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

La invención también se refiere al uso de un Nanocuerpo de la invención y/o de un polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica, en particular en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento (que incluye pero no se limita a alivio de al menos un síntoma) de una enfermedad o trastorno mediado por TNF-alfa y/o asociado con TNF-alfa (por ejemplo, asociado con actividad anormal de TNF-alfa, niveles anormales de TNF-alfa, expresión anormal de TNF-alfa y/o sensibilidad o respuesta anormal a TNF-alfa), o de un fenómeno biológico asociado con sensibilidad o respuesta anormal a TNF-alfa,

tal como una de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente.

La invención también se refiere a un método para prevenir y/o tratar (incluye pero no se limita al alivio de al menos un síntoma) de una enfermedad o trastorno mediado por TNF-alfa y/o asociado con TNF-alfa (por ejemplo, asociado con una actividad anormal de TNF-alfa, niveles anormales de TNF-alfa, expresión anormal de TNF-alfa y/o sensibilidad o respuesta anormal a TNF-alfa, o de un fenómeno biológico asociado con TNF-alfa), tal como una de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente, dicho método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica como se describe anteriormente.

La presente invención proporciona polipéptidos que comprenden uno o más anticuerpos dirigidos hacia factor alfa de necrosis de tumor (TNF-alfa). La presente invención además se refiere a su uso en diagnosis y terapia. Tales anticuerpos pueden tener una secuencia de estructura con alta homología a las secuencias de estructura de humano. Se describen composiciones que comprenden anticuerpos para factor alfa de necrosis de tumo (TNF-alfa) solas o en combinación con otros fármacos.

El factor alfa de necrosis de tumor (TNF-alfa) se cree que juega un papel importante en varios trastornos, por ejemplo, en trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y esclerosis múltiple. Tanto TNF-alfa como los receptores (CD120a, CD120b) se han estudiado en mayor detalle. El TNF-alfa en su forma bioactiva en un trímero y la ranura formada por subunidades cercanas es importante para la interacción citocina-receptor. Se han desarrollado varias estrategias para antagonizar la acción de la citocina y actualmente se usan para tratar varios estados de enfermedad.

Un inhibidor TNF-alfa el cual tiene suficiente especificidad y selectividad para TNF-alfa puede ser un compuesto farmacéutico terapéutico o profiláctico para prevenir o tratar trastornos en donde TNF-alfa se ha implicado como agente causativo. Se han descrito métodos para tratar choque tóxico (EP 486526), regresión de tumor, inhibición de cotitoxicidad (US 6448380, US 6451983, US 6498237), enfermedad autoinmune tal como RA y enfermedad de Crohn (EP 663836, US 5672347, US 5656272), injerto contra reacción del hospedante (US 5672347), meningitis bacteriana (EP 585705) por medio de un anticuerpo para TNF-alfa.

Aún ninguno de los fármacos actualmente disponibles son completamente efectivos para el tratamiento

de enfermedad autoinmune, y más se limitan por toxicidad severa. Además, es extremadamente difícil y un proceso largo desarrollar una nueva entidad química (NCE) con suficiente potencia y selectividad para tal secuencia objetivo. Terapéuticos a base de anticuerpo por otro lado tienen potencial significante como fármacos porque tiene especificidad exquisita a su objetivo y una toxicidad inherente baja. Además, el tiempo de desarrollo puede ser considerablemente reducido cuando se compara al desarrollo de nuevas entidades químicas (NCE). Sin embargo, se dificultan aumentar anticuerpos convencionales contra proteínas multiméricas en donde el dominio unido al receptor del ligando es incrustado en una ranura, como es el caso con TNF-alfa. Se describen en la invención anticuerpos de cadena pesada los cuales se suministran de Camelidae, se conocen por tener propensión a unión de cavidad (WO97/49805; Lauwereys et al., EMBO J. 17, 5312, 1998)). Por lo tanto, tales anticuerpos de cadena pesada son adecuadamente inherentes para unir dominios de enlace al receptor de tales ligandos como TNF. Además, tales anticuerpos se conocen por ser estables durante largos periodos de tiempo, por lo tanto incrementar su vida media (Perez et al., Biochemistry, 40, 74, 2001). Además, tales fragmentos de anticuerpo de cadena pesada pueden ser producidos "en masa" en fermentadores, usando sistemas de

expresión económicos comparados a fermentación de cultivo celular de mamífero, tal como levaduras y otros microorganismos (EO 0 698 097).

El uso de anticuerpos derivados de fuentes tales como ratón, oveja, cabra, conejo, etc., y humanizados derivados de los mismos como un tratamiento para condiciones las cuales requieren una modulación de inflamación, es problemático por varias razones. Anticuerpos tradicionales no son estables a temperatura ambiente, y pueden ser refrigerados para preparación y almacenaje, que requiere equipamiento de laboratorio refrigerado necesario, almacenaje y transporte, lo cual contribuye hacia tiempo y costo. La refrigeración es algunas veces no factible en países en desarrollo. Además, la manufactura o producción a escala menor de dichos anticuerpos es costoso porque los sistemas celulares de mamífero necesarios para la expresión de anticuerpos intactos y activos requieren altos niveles de soporte en términos de tiempo y equipamiento, y los rendimientos son muy bajos. Además el tamaño grande de anticuerpos convencionales, puede restringir la penetración de tejido, por ejemplo, en el sitio de tejido inflamado. Además, anticuerpos tradicionales tiene una actividad enlazante la cual depende del pH, y por lo tanto son inadecuados para uso en ambientes externos del intervalo de pH fisiológico

usual tal como, en hemorragia gástrica, cirugía gástrica. Además, los anticuerpos tradicionales son inestables a pH menor o mayor y por lo tanto no son adecuados para administración oral. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos camelidae resisten condiciones severas, tal como pH extremo, reactivos de desnaturalización y temperaturas altas (Dumoulin et al., Protein Science 11, 500, 2002), para hacerlos adecuados para suministro por administración oral. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad enlazante, la cual depende de la temperatura, y por lo tanto son inadecuados para uso en ensayos o kits de funcionamiento a temperaturas fuera de intervalos de temperatura biológicamente activa (por ejemplo, 37 ± 20°C).

Terapéuticos de polipéptido y en particular terapéuticos en base a anticuerpos tienen potencial significante como fármacos porque tienen especificidad exquisita para su objetivo y una toxicidad inherente baja. Sin embargo, se conoce por el experto destinatarios que un anticuerpo, el cual ha sido obtenido para un objetivo terapéuticamente útil requiere modificación adicional para preparar para terapia humana, para evitar una reacción inmunológica no deseada en un individuo humano en la administración de este. El proceso de modificación es comúnmente llamado "humanización". Se conoce por el experto

359

en la técnica que anticuerpos cultivados en especies, diferentes a humanos, requieren humanización para proporcionar los anticuerpos terapéuticamente útil en humanos ((1) injerto CDR: Proteina Design Labs: US 6180370, US 5693761; Genentech US 6054297; Celltech: 460167, EP 626390, US 5859205; (2) Veneering: Xoma: US 586919, US 5766886, US 5821123). Existe una necesidad para un método para producir anticuerpos, los cuales evitan el requerimiento para humanización sustancial, o los cuales completamente obvian la necesidad para humanización. Existe una necesidad para una nueva clase de anticuerpos, los cuales tienen regiones de estructura definida o residuos de aminoácido y los cuales pueden ser administrados a un sujeto humano sin el requerimiento para humanización sustancial, o la necesidad para humanización completa.

Otra importante desventaja de anticuerpos convencionales es que son complejos, moléculas grandes y por lo tanto relativamente inestables, y son sensibles a rompimiento por proteasa. Esto significa que los fármacos de anticuerpo convencional no pueden ser administrados oralmente, sublingualmente, tópicamente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente o por inhalación porque no resisten el pH bajo en estos sitios, la acción de proteasa en estos sitios y en la sangre y/o porque su tamaño es grande. Tienen que ser administrados por inyección

(intravenosamente, subcutáneamente, etc.) para superar alguno de estos problemas. La administración por inyección requiere capacitación especial para uso de una jeringa y aguja hipodérmica correctamente y seguramente. Además se requiere equipamiento estéril, una formulación líquida del polipéptido terapéutico, vía envasado del polipéptido en una forma estéril y estable y, del sujeto, un sitio adecuado para meter la aguja. Además, los sujetos comúnmente experimentan estrés físico y psicológico antes a y después de recibir una inyección. Por lo tanto, existe una necesidad para un método para el suministro de polipéptidos terapéuticos el cual evita la necesidad de inyección la cual no es únicamente ahorro costo/tiempo, pero el cual también es más conveniente y más confortable para el sujeto.

Terapéuticos en base a Nanocuerpos tienen potencial significante como fármacos porque tienen especificidad exquisita para su objetivo y una toxicidad inherente baja. Sin embargo, mejorando además su afinidad intrínseca y funcional puede conducir a muchos beneficios para un paciente, tal como reducir la dosis del terapéutico; terapia más rápida y efectos colaterales reducidos.

Una modalidad de la presente invención es un Nanocuerpos anti-TNF-alfa, dicho nanocuerpos es

preferiblemente como además se define anteriormente.

Una modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende al menos un anticuerpos anti-TNF-alfa, dicho polipéptido es preferiblemente como además se define anteriormente.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe además anteriormente, que comprende al menos un nanocuerpos directamente contra una proteína de suero.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, en donde la proteína de suero es cualquier albúmina de suero, inmunoglobulinas de suero, proteína que se enlaza a tiroxina, transferrina o fibrógeno.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, además comprende al menos un nanocuerpo seleccionado del grupo que consiste de nanocuerpo anti-IFN-gama, nanocuerpo del receptor anti-TNF-alfa y nanocuerpo del receptor anti-IFN-gama.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, en donde el número de nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa es al menos dos.

Otra modalidad de la presente invención es un

polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, en donde al menos un nanocuerpo es un V_{HH}s Camelidae humanizado.

Otra modalidad de la presente invención es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa, como se describe anteriormente y al menos un nanocuerpo del grupo que consiste de nanocuerpos anti-IFN-gama, nanocuerpo del receptor anti-TNF-alfa y nanocuerpo del receptor anti-IFN-gama, para simultáneamente, administración separada o secuencial a un sujeto.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-THF-alfa como se describe anteriormente, o una composición como se describe anteriormente, en donde el nanocuerpo es una secuencia homóloga, una porción funcional o una porción funcional de una secuencia homóloga del nanocuerpo de longitud completa.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, o una composición como se describe anteriormente, en donde el polipéptido anti-TNF-alfa es una secuencia homóloga, una porción funcional, o una porción funcional de una secuencia homóloga del polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente en

donde al menos un nanocuerpo es un V_{HH} Camelidae.

Otra modalidad de la presente invención es un ácido nucleico que codifica un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente.

Otra modalidad de la presente invención es un método para identificar un agente que modula el enlace de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, para Factor alfa de Necrosis del Tumor que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente con un objetivo que es Factor alfa de Necrosis del Tumor, en la presencia y ausencia de un modulador candidato bajo condiciones que permite en enlace entre el polipéptido y objetivo, y

(b) medir el enlace entre el polipéptido y objetivo de la etapa (a), en donde una disminución en el enlace en la presencia del modulador candidato, en relación al enlace en la ausencia del modulador candidato identifica el modulador candidato como un agente que modula el enlace de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente y Factor alfa de Necrosis de Tumor.

Otra modalidad de la presente invención es un método para identificar un agente que modula trastornos mediados por el Factor alfa de Necrosis de Tumor a través del enlace de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe

anteriormente para Factor alfa de Necrosis del Tumor que comprende:

(a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente con un objetivo que es Factor alfa de Necrosis de Tumor, en la presencia y ausencia de un modulador candidato bajo condiciones que permiten en enlace entre el polipéptido y el objetivo, y

(b) medir el enlace entre el polipéptido y objetivo de la etapa (a), en donde una disminución en el enlace en la presencia del modulador candidato, en relación al enlace en la ausencia del modulador candidato identificado, el modular candidato como un agente que modula trastornos mediados por el Factor alfa de Necrosis de Tumor.

Otra modalidad de la presente invención es un método para identificar un agente que modula el enlace del Factor alfa de Necrosis de Tumor a su receptor, a través del enlace de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente para Factor alfa de Necrosis de Tumor que comprende:

(a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente con un objetivo que es Factor alfa de Necrosis de Tumor, en la presencia y ausencia de un modular candidato bajo condiciones que permiten en enlace entre el polipéptido y objetivo, y

(b) medir en enlace entre el polipéptido y objetivo de la etapa (a), en donde disminuye el enlace en la presencia del modulador candidato, en relación al enlace en la ausencia del modulador candidato identificado como el modulador candidato como un agente que modula el enlace del Factor alfa de Necrosis de Tumor para su receptor.

Otra modalidad de la presente invención es un kit para selección de los agentes que modula trastornos mediados por el Factor alfa de Necrosis de Tumor, que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente y Factor alfa de Necrosis de Tumor.

Otra modalidad de la presente invención es un agente desconocido que modula el enlace de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente para Factor alfa de Necrosis de Tumor, identificado de conformidad con el método descrito anteriormente.

Otra modalidad de la presente invención es un agente desconocido que modula trastornos mediados por el Factor alfa de Necrosis de Tumor, identificado de conformidad con los métodos como se describen anteriormente.

Otra modalidad de la presente invención es un agente desconocido como se describe anteriormente, en donde los trastornos son una o más inflamaciones, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa,

síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, o un ácido nucleico como se describe anteriormente, o una composición como se describe anteriormente, o un agente como se describe anteriormente para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos que se relacionan a procesos inflamatorios.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o un ácido nucleico como se describe anteriormente, o una composición como se describe anteriormente, o un agente como se describe anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos que se relacionan a reacciones inflamatorias.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-inflamatorio como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través del ambiente gástrico sin que la sustancia sea activada.

Otra modalidad de la presente invención es un uso

de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles para modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través del ambiente gástrico son que la sustancia sea activada.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles para modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado al tracto vaginal y/o rectal.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles para modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado al tracto vaginal o rectal.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para tratar

y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado a la nariz, tracto respiratorio superior y/o pulmón.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como de describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles para modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado a la nariz, tracto respiratorio superior y/o pulmón.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o alivio de trastornos susceptibles para modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que se suministra a la mucosa intestinal, en donde el trastorno incrementa la permeabilidad de la mucosa intestinal.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos

susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que se suministra a la mucosa intestinal, en donde el trastorno incrementa la permeabilidad de la mucosa intestinal.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención el cual es capaz de pasar a través de los tejidos por atrás de la lengua efectivamente.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención la cual es capaz a través de los tejidos por atrás de la lengua efectivamente.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasa a través de la piel efectivamente.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente o una composición como se describe anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través de la piel efectivamente.

Otra modalidad de la presente invención es un método como se describe anteriormente, un kit como se describe anteriormente, un ácido nucleico o agente como se describe anteriormente, uso de un ácido nucleico o agente como se describe anteriormente, una composición como se describe anteriormente, uso de una composición como se describe anteriormente, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente en donde los trastornos son cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotitis autoinmune, Diabetes Tipo I, Epididimitis, Glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia Hemolítica, Lupus eritematoso sistémico, infertilidad del macho, esclerosis

múltiple, Myasthenia Gravis, Pénfigos, Psoriasis, fiebre reumática, artritis reumática, Sarcoiditis, Escleroderma, síndrome de Sjogren, Espondilo artropatías, Tiroiditis y Vasculitis.

Otra modalidad de la presente invención es una composición que comprende un ácido nucleico o agente como se describe anteriormente, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, o una composición como se describe anteriormente, y un vehículo farmacéutico adecuado.

Otra modalidad de la presente invención es un método para diagnosticar un trastorno caracterizado por la disfunción del Factor alfa de Necrosis de Tumor que comprende:

(a) poner en contacto una muestra con un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente,

(b) detectar un enlace del polipéptido a la muestra; y

(c) comparar el enlace detectado en la etapa (b) con un estándar, en donde una diferencia en enlace relativo a la muestra es diagnóstico de un trastorno caracterizado por disfunción del Factor alfa de Necrosis de Tumor.

Otra modalidad de la presente invención es un kit para seleccionar un trastorno como se cita anteriormente, usando un método como se describe anteriormente.

Otra modalidad de la presente invención es un kit para seleccionar un trastorno como se cita anteriormente, que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa aislado como se describe anteriormente.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente para la purificación del Factor alfa de Necrosis de Tumor.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente para inhibir la interacción entre el Factor alfa de Necrosis de Tumor y uno o más receptores del Factor alfa de Necrosis de Tumor.

Otra modalidad de la presente invención es un método para producir un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, que comprende las etapas de:

(a) obtener un ADN de ramificación doble que codifica un V_{HH} Camelidae dirigido al Factor alfa de Necrosis de Tumor,

(b) clonar y expresar el ADN seleccionado en la etapa (b).

Otra modalidad de la presente invención es un método para producir un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, que comprende:

(a) cultivar las células hospedantes, que

comprende ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente, bajo condiciones que permite la expresión del polipéptido, y,

(b) remover el polipéptido producido del cultivo.

Otra modalidad de la presente invención es un método como se describe anteriormente, en donde las células hospedantes son bacterias y levaduras.

Otra modalidad de la presente invención es un kit para seleccionar cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio o esclerosis múltiple que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe anteriormente.

V_{HH}s, de conformidad con la presente invención, y como se conoce por destinatario experto son dominios variables de cadena pesada derivados de inmunoglobulinas que carecen naturalmente de cadenas ligeras tales como aquellas derivadas de Camelidae como se describe en el documento WO 94/04678 (y referido en adelante como dominios V_{HH} o nanocuerpos). Las moléculas V_{HH} son aproximadamente 10x más pequeñas que las moléculas IgG. Son polipéptidos únicos y muy estables, que resisten pH y condiciones de temperatura extremas. Sin embargo, son resistentes a la acción de proteasas lo cual no es el caso para anticuerpos convencionales. Además, la expresión in vitro de V_{HH}s

produce alto rendimiento, V_{HH}s funcional apropiadamente plegada. Además, anticuerpos generados en Camélidos reconocerán epítopes diferentes de aquellos reconocidos por anticuerpos generados in vitro a través del uso de bibliotecas de anticuerpo vía inmunización de mamífero diferentes de Camélidos (WO 9749805). Tal como, V_{HH}s anti-TNF-alfa puede interactuar más eficientemente con TNF-alfa que anticuerpos convencionales, por lo tanto bloquea su interacción con el receptor TNF-alfa más eficientemente.

El TNF-alfa es también un fragmento de TNF-alfa, capaz de provocar una respuesta inmune. El TNF-alfa es también un fragmento de TNF-alfa, capaz de enlazare a un nanocuerpo mejorado contra el TNF-alfa de longitud completa.

Un nanocuerpo dirigido contra TNF-alfa significa nanocuerpo que es capaz de enlazarse a TNF-alfa con una afinidad de superior que 10^{-6}M.

Una modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF, en donde los nanocuerpos comprenden V_{HH} Camelidae dirigido contra TNF-alfa.

Uno o más anticuerpos del polipéptido anti-TNF los cuales son dirigidos contra un TNF-alfa puede ser de la misma secuencia. Alternativamente no todos pueden tener la misma secuencia. Dentro del alcance de la invención que un polipéptido anti-TNF comprende nanocuerpos anti-TNF-alfa

las cuales no todos comparten la misma secuencia, pero las cuales se dirigen contra el mismo objetivo, uno o más antígenos del mismo.

La presente invención además se refiere a un polipéptido anti-TNF-alfa, en donde el nanocuerpo es un V_{HH} dirigido contra TNF-alfa, en donde el V_{HH} pertenece a una clase que tiene secuencias similares a la humana. Las clases se caracterizan porque V_{HH} porta un aminoácido a partir del grupo que consiste de glicona, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina, serina, treonina, aspargina o glutamina en posición 45, tal como, por ejemplo, L45 y un triptofano en posición 103, de conformidad con la numeración Kabat. Otra clase similar a la humana de nanocuerpos Camelidae se han descrito en el documento WO03035696 y contiene los residuos FR2 hidrofóbicos típicamente encontrados en anticuerpos convencionales de origen humano o de otras especies, pero compensando esta pérdida en hidrofilicidad por el residuo de arginina cargada en posición 103, que sustituye el residuo de triptofano conservado presente en VH de anticuerpos de cadena doble. Como tal, los péptidos que pertenecen a estas dos clases muestran una homología de secuencia de aminoácido alta a regiones de estructura VH humana y los péptidos pueden ser administrados a un humano directamente

sin expectativa de una respuesta inmune indeseada de ahí, y sin la carga de humanización adicional. La invención también se refiere a ácidos nucleicos capaces de codificar los polipéptidos.

Cualquiera de los V_{HH} como se usan por la invención pueden ser de la clase tradicional o de la clase de anticuerpos Camelidae similar a humanos. Los anticuerpos se pueden dirigir contra TNF-alfa completo o un fragmento del mismo, o un fragmento de una secuencia homologa del mismo. Estos polipéptidos incluyen los anticuerpos Camelidae de longitud completa, llamados dominios Fc y V_{HH}, versiones quiméricas de anticuerpos Camelidae de cadena pesada con un dominio Fc humano o V_{HH} por si mismos o fragmentos derivados.

Los V_{HH} de albúmina anti-suero pueden interactuar en una manera más eficiente con albúmina de suero que anticuerpos convencionales los cuales se conoce por ser una proteína portadora. Como una proteína portadora algo de los epítopes de albúmina de suero pueden ser inaccesibles por proteínas enlazadas, péptidos y compuestos químicos pequeños. Ya que se conocen V_{HH} por unirse a epítopes "inusuales" o no convencionales tales como cavidades (WO 97/49805), la afinidad de tal V_{HH} que hace circular albúmina puede ser incrementada.

La presente invención se refiere al

descubrimiento que un polipéptido anti-TNF como se describe en este documento, además comprende uno o más anticuerpos dirigidos contra una o más proteínas de suero de un sujeto, sorprendentemente tiene vida media prolongada en la circulación del sujeto, comparado con la vida media del nanocuerpo anti-TNF-alfa cuando no parte del constructo. Además, los polipéptidos se encuentran por exhibir las mismas propiedades favorables de nanocuerpos tal como alta estabilidad que permanece intacta en ratones, resistencia a pH extremo, estabilidad a alta temperatura y alta afinidad de objetivo.

La proteína de suero puede ser cualquier proteína adecuada encontrada en el suero del sujeto. En un aspecto de la invención, la proteína de suero es albúmina de suero, inmunoglobulinas de suero, proteínas que se enlazan a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. Dependiendo del uso planeado, tal como la vida media requerida para tratamiento efectivo y/o formación en compartimiento del antígeno objetivo, el precursor V_{HH} se puede dirigir a una de las proteínas de suero anteriores.

De acuerdo a un aspecto específico, pero no limitante de la invención, el Nanocuerpo contra albúmina de suero humano que consiste de 4 regiones de estructura (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes complementarias (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el cual:

(iv) CDR1 es una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

SFGMS	[SEC ID NO: 36]
LNLMG	[SEC ID NO: 37]
INLLG	[SEC ID NO: 38]
NYWMY;	[SEC ID NO: 39]

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 2 o únicamente 1 "diferencias de aminoácido" (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido anteriores en la cual:

(1) cualquiera de las sustituciones de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento) y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente únicamente consiste de sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácido anterior;

y en la cual:

(v) CDR2 es una secuencia de aminoácido escogida del grupo que consiste de:

SISGSGSDTLYADSVKG	[SEC ID NO: 40]
TITVGDSTNYADSVKG	[SEC ID NO: 41]
TITVGDSTSYADSVKG	[SEC ID NO: 42]
SINGRGDDTRYADSVKG	[SEC ID NO: 43]
AISADSSTKNYADSVKG	[SEC ID NO: 44]
AISADSSDKRYADSVKG	[SEC ID NO: 45]
RISTGGGYSYYADSVKG	[SEC ID NO: 46]

o el grupo que consiste secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99%, identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido anteriores; en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento); y/o

(2) secuencia de aminoácido preferiblemente únicamente contiene sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácido anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o únicamente 1 "diferencias de aminoácido"

380

(como se define anteriormente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento); y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente únicamente contiene sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácidos anteriores;

y en la cual:

(iv) CDR3 es una secuencia de aminoácido escogida del grupo que consiste de:

DREAQVDTLDFDY [SEQ ID NO: 47]

o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con una de las secuencias de aminoácido anteriores; en las cuales

(1) cualquier sustitución es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento) y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente

únicamente contiene sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácido anteriores;

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tiene 3, 2 o únicamente 1 "diferencias de aminoácido" (como se define anteriormente) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento) y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente únicamente contiene sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácido anteriores;

o del grupo que consiste de:

GGSLSR	[SEC ID NO: 48]
RRTWHSEL	[SEC ID NO: 49]
GRSVSRS	[SEC ID NO: 50]
GRGSP	[SEC ID NO: 51]

y/o del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o únicamente 1 "diferencia de aminoácido" (como se define en este documento) con una de las secuencias de

382

amino ácido anteriores, en las cuales:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento); y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente únicamente contiene sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácido anteriores.

En otro aspecto, la invención se refiere a un Nanocuerpo contra albúmina de suero humano, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes complementarias (CDR1 a CDR3 respectivamente), la cual se escoge del grupo que consiste de anticuerpos de dominio y/o anticuerpos de dominio únicos con una de las siguientes combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente:

- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** SISGSGSDTLYADSVKG; **CDR3:** GGSLSR;
- **CDR1:** LNLMG; **CDR2:** TITVGDSTNYADSVKG; **CDR3:** RRTWHSEL;
- **CDR1:** INLLG; **CDR2:** TITVGDSTSYADSVKG; **CDR3:** RRTWHSEL;
- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** SINGRGDDTRYADSVKG; **CDR3:** GRSVSRS;
- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** AISADSSDKRYADSVKG; **CDR3:** GRGSP;
- **CDR1:** SFGMS; **CDR2:** AISADSSDKRYADSVKG; **CDR3:** GRGSP;
- **CDR1:** NYWMY; **CDR2:** RISTGGGYSYYADSVKG; **CDR3:** DREAQVDTLDFDY.

En los nanocuerpos de la invención que comprende

las combinaciones de CDR mencionados anteriormente, cada CDR puede ser reemplazado por un CDR escogido del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen al menos 80%, preferiblemente 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en este documento) con los CDR mencionados, en los cuales

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento); y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente únicamente contiene sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácido anteriores;

y/o escogidos del grupo que consiste de secuencias de aminoácido que tienen 3, 2 o únicamente 1 (como se indica en el párrafo precedente) "diferencias de aminoácido" (como se define en este documento) con los CDR mencionados, una de las secuencias de aminoácido anteriores; en las cuales:

(1) cualquiera de las sustituciones de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo (como se define en este documento); y/o

(2) la secuencia de aminoácido preferiblemente únicamente contiene sustituciones de aminoácido, y sin supresiones o inserciones de aminoácido, comparado a las secuencias de aminoácido anteriores.

Sin embargo, de los Nanocuerpos de la invención que comprenden las combinaciones de CDR mencionados anteriormente, Nanocuerpos que comprenden uno o más CDR listados anteriormente son particularmente preferidos; Nanocuerpos que comprenden dos o más de los CDR listados anteriormente son más particularmente preferidos; y Nanocuerpos que comprenden tres de los CDR listados anteriormente son más particularmente preferidos.

En estos Nanocuerpos contra albúmina de suero humano, las regiones de estructura FR1 a FR4 son preferiblemente como se define anteriormente para los Nanocuerpos de la invención.

Particularmente Nanocuerpos preferidos contra albúmina de suero humano se seleccionan de grupos que consisten de SEC ID NOs: 61 a 67, SEC ID NOs: 87 a 89 y SEC ID NOs: 100-104. Las combinaciones preferidas de CDR y regiones de estructura presentes en estos Nanocuerpos también se listan en la Tabla II.

Tabla II. Combinación preferida de secuencias de estructura y CDR en Nanocuerpos contra albúmina de suero humano

Clone	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
PMP6A8 (ALB2)	36 8	AVQLVESGGGLVQGGG SLRLACAASERIFD	37 5	LNLMG	38 2	WYRQGPGN ERELVA	38 9	TCITVGDSTNYA DSVKG	39 6	RFTISMDYTKQTVYLHMN SLRPEDTGLYYCKI	40 3	RRTWHSEL	41 0	WGQGTQV TVSS
PMP6B4	36 9	EVQLVESGGGLVQEGG SLRLACAASERIWD	37 6	INLLG	38 3	WYRQGPGN ERELVA	39 0	TITVGDSTSYAD SVKG	39 7	RFTISRDYDKNTLYLQMN SLRPEDTGLYYCKI	40 4	RRTWHSEL	41 1	WGQGTQV TVSS
PMP6A6 (ALB1)	37 0	AVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFR	37 7	SFGMS	38 4	WVRQAPGK EPEWVS	39 1	SISGSGSDTLYA DSVKG	39 8	RFTISRDNAKTTLYLQMN SLKPEDTAVYYCTI	40 5	GGSLSR	41 2	SSQGTQV TVSS
PMP6C1	37 1	AVQLVDSGGGLVQPGG SLRLSCAASGFSFG	37 8	SFGMS	38 5	WVRQYPGK EPEWVS	39 2	SINGRGDDTRYA DSVKG	39 9	RFSISRDNAKNTLYLQMN SLKPEDTAEYYCTI	40 6	GRSVSRS	41 3	RTQGTQV TVSS
PMP6G8	37 2	AVQLVESGGGLVQPGG SLRLTCTASGFTFR	37 9	SFGMS	38 6	WVRQAPGK DQEWVS	39 3	AISADSSTKNYA DSVKG	40 0	RFTISRDNAKKMLYLEMN SLKPEDTAVYYCVI	40 7	GRGSP	41 4	SSPGTQV TVSS
PMP6A5	37 3	QVQLAESGGGLVQPGG SLRLTCTASGFTFG	38 0	SFGMS	38 7	WVRQAPGE GLEWVS	39 4	AISADSSDKRYA DSVKG	40 1	RFTISRDNAKKMLYLEMN SLKSEDTAVYYCVI	40 8	GRGSP	41 5	ASQGTQV TVSS
PMP6G7	37 4	QVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS	38 1	NYWMY	38 8	WVRVAPGK GLERIS	39 5	RDISTGGGYSYY ADSVKG	40 2	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLKPEDTALYYCAK	40 9	DREAQVDTLD FDY	41 6	RGQGTQV TVSS

385

Otro aspecto de la invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, además que comprende al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido anti-IFN-gama, un polipéptido del receptor anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor anti-IFN-gama.

De acuerdo a un aspecto de la invención, un nanocuerpo se dirige contra el receptor TNF-alfa. El nanocuerpo puede ser un V_{HH} Camelidae.

De acuerdo a un aspecto de la invención, un nanocuerpo se dirige contra el receptor IFN-gama. El nanocuerpos puede ser un V_{HH} Camelidae.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar una enfermedad autoinmune o condición como se cita en este documento, que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de un polipéptido anti-TNF-alfa, además comprende al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido anti-IFN-gama, polipéptido del receptor anti-TNF-gama y polipéptido del receptor anti-IFN-gama, tal como polipéptidos unidos entre sí como se describe abajo.

Tales constructos multi-específicos pueden tener potencia mejorada como compuesto terapéutico inflamatorio sobre constructos mono-específicos.

Un aspecto de la invención es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento y al menos un polipéptido se selecciona del grupo que consiste de polipéptido anti-IFN-gama, polipéptido del receptor anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor anti-IFN-gama, para administración simultánea, separada o secuencia a un sujeto.

Un aspecto de la invención es un método para tratar una

enfermedad autoinmune que comprende administrar a un individuo, una cantidad efectiva de un polipéptido anti-TNF-alfa y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de polipéptido anti-IFN-gama, polipéptido del receptor anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor anti-IFN-gama, simultáneamente, separadamente o secuencialmente.

Otro aspecto de la invención es un kit que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de polipéptido anti-IFN-gama, polipéptido del receptor anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor anti-IFN-gama para administración simultánea, separada o secuencia a un sujeto. Es un aspecto de la invención que el kit se puede usar de conformidad con la invención. Es un aspecto de la invención que el kit se puede usar para tratar las enfermedades como se cita en este documento.

Por administración simultánea significa que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo. Por ejemplo, como una mezcla de los polipéptidos o una composición que comprende los polipéptidos. Por ejemplo, como una mezcla de los polipéptidos o una composición que comprende los polipéptidos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a una solución administrada intravenosamente, una tableta, líquido, crema tópica, etc., en donde cada preparación comprende las propiedades de interés.

Por administración separada significa que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo. Los polipéptidos están presentes en el kit como preparaciones no mezcladas, separadas. Por ejemplo, los polipéptidos diferentes pueden estar presentes en el

kit como tabletas individuales. Las tabletas pueden ser administradas al sujeto tragando ambas tabletas al mismo tiempo, o una tableta directamente después de la otra.

Por administración secuencial significa que los polipéptidos se administran a un sujeto secuencialmente. Los polipéptidos están presentes en el kit como preparaciones separadas, no mezcladas. Existe un tiempo de intervalo entre dosis. Por ejemplo, un polipéptido puede ser administrado hasta 336, 312, 288, 264, 240, 216, 192, 168, 144, 120, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1 ó 0.5 horas después del otro componente.

En administración secuencial, un polipéptido puede ser administrado una vez, o cualquier número de veces y en varias dosis antes y/o después de la administración de otro polipéptido. La administración secuencial se puede combinar con administración simultánea o secuencial.

Los usos médicos de un polipéptido anti-TNF-alfa descrito abajo, también aplican a la composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de polipéptido anti-IFN-gama, polipéptido del receptor anti-THF-alfa y polipéptido del receptor anti-IFN-gama, para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto como se describe en este documento anteriormente.

De acuerdo a un aspecto de la invención, un polipéptido anti-IFN-gama, un nanocuerpo anti-TNF-gama se dirige contra IFN-gama. El nanocuerpo puede ser un V_{HH} Camelidae.

De acuerdo a un aspecto de la invención, un nanocuerpo anti-TNF-alfa se dirige contra el receptor TNF-alfa. El nanocuerpo puede ser un V_{HH} Camelidae.

De acuerdo a un aspecto de la invención, un polipéptido del receptor anti-IFN-gama, un nanocuerpo anti-TNF-alfa se dirige contra el receptor IFN-gama. El nanocuerpo puede ser un V_{HH} Camelidae.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, en donde el número de nanocuerpos que se dirige contra THF-alfa es dos o más. Tales polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen la ventaja de afinidad funcional inusualmente alta para el objetivo, exhibiendo mucho mayores propiedades inhibitorias que las esperadas compararas a su contraparte monovalente.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen afinidades funcionales que son varias órdenes de magnitudes mayores que los polipéptidos anti-TNF-alfa originales monovalentes. Se ha encontrado que las afinidades funcionales de estos polipéptidos anti-TNF-alfa son mucho mayores que aquellos reportados en la técnica anterior para anticuerpos bivalente o multivalente. Sorprendentemente, los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención enlazados entre sí directamente o vía una secuencia enlazadora corta, muestran las afinidades funcionales altas esperadas teóricamente con anticuerpos de cuatro cadenas convencionales multivalentes.

Se ha encontrado que tales actividades funcionales muy incrementadas pueden ser detectadas preferiblemente con antígenos compuestos de proteínas multidominio y multiméricas, ya sea en ensayos de enlace lineal o en ensayos funcionales, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad.

Los nanocuerpos pueden estar unidos para formar cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento, que

391

comprenden más de uno de los anticuerpos usando métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, se pueden fusionar por reticulación química haciendo reaccionar residuos de aminoácido con un agente de derivación orgánico tal como se describe por Blattler et al., Biochemistry 24, 1517-1524; EP294703. Alternativamente, el nanocuerpos puede ser fusionado genéticamente en el nivel ADN, es decir, un constructo de polinucleótido formado el cual codifica el constructo de polipéptido completo, que comprende uno o más nanocuerpos anti-objetivo y uno o más nanocuerpos de proteína anti-suero. Un método para reducir un constructo de polipéptido V_{HH} multivalente o bivalente se describe en la solicitud de patente PCT WO 96/34103. Un método de nanocuerpos múltiples unidos es vía la ruta genética enlazando secuencias que codifican nanocuerpos ya sea directamente o por un enlazador de péptido. Por ejemplo, el extremo C-terminal del primer nanocuerpos puede ser enlazado un extremo N-terminal del nanocuerpo siguiente. Esta forma enlazada se puede extender para enlazar nanocuerpos adicionales para la construcción y producción de tri-, tetra-, etc., constructos funcionales.

De acuerdo a un aspecto de la presente invención, los nanocuerpos están enlazados entre sí directamente, sin uso de un enlazador. Contrario a anticuerpos convencionales voluminosos unidos en donde una secuencia enlazadora se necesita retener actividad enlazante en las dos subunidades, polipéptidos de la invención pueden ser directamente enlazados, así evitando los problemas potenciales de la secuencia enlazadora, tal como antigenicidad cuando se administra a un sujeto humano, inestabilidad de la secuencia enlazadora que conduce a

disociación de las subunidades.

De acuerdo a otro aspecto de la presente invención, los nanocuerpos se enlazan entre sí vía una secuencia enlazadora del péptido. Tal secuencia enlazadora puede ser una secuencia que se origina de forma natural o una secuencia que se origina de forma no natural. La secuencia enlazadora se espera ser no inmunogénica en el sujeto al cual se administra el polipéptido anti-TNF-alfa. La secuencia enlazadora puede proporcionar suficiente flexibilidad al polipéptido anti-TNF-alfa, al mismo tiempo es resistente a degradación proteólica. Un ejemplo no limitante de una secuencia enlazadora es uno que se puede derivar de la región articulada de V_{HH} descritos en el documento 96/34103.

De acuerdo a otro aspecto de la presente invención, nanocuerpos multivalentes que comprenden más de dos nanocuerpos, pueden estar enlazados entre sí directamente o vía una secuencia enlazadora. Tales constructos son difíciles para producir con anticuerpos convencionales y debido a un obstáculo estérico de las subunidades voluminosas, funcionalmente pueden ser olvidadas o enormemente disminuidas más que incrementado considerablemente como se observa con V_{HH} de la invención comparado al constructo monovalente.

Los constructos de polipéptido descritos en este documento, se pueden elaborar por el experto en la técnica de conformidad con métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, V_{HH} pueden ser obtenidos usando métodos conocidos en la técnica tal como inmunizando un canal y obtener hibridomas de esto, o clonando una biblioteca de nanocuerpos usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y selección subsecuente usando exhibición del fago.

De acuerdo a un aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. De acuerdo a otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. De acuerdo a otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. De acuerdo a otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. De acuerdo a un aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede comprender una secuencia de un polipéptido anti-TNF-alfa.

De acuerdo a un aspecto de la invención, un nanocuerpo usado para formar un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser un nanocuerpo completo (por ejemplo, un V_{HH}) o una secuencia homóloga del mismo. De acuerdo a otro aspecto de la invención, un nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de un nanocuerpo completo. De acuerdo a otro aspecto de la invención, un nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de un nanocuerpo completo. De acuerdo a otro aspecto de la invención, un nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un nanocuerpo completo.

Como se usa en este documento, una secuencia homóloga de la presente invención, puede comprender adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos, los cuales no son sustancialmente alterados de las características funcionales de

los polipéptidos de la invención. El número de supresiones o sustituciones de aminoácido es preferiblemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70 aminoácidos.

Una secuencia homóloga de conformidad con la presente invención puede ser un polipéptido modificado por la adición, supresión, o sustitución de aminoácidos, tal modificación sustancialmente no altera las características funcionales compradas con el polipéptido no modificado.

Una secuencia homóloga de conformidad con la presente invención, puede comprender un polipéptido modificado por la adición, supresión o sustitución de aminoácidos, tal modificación sustancialmente no altera las características funcionales comparadas con el polipéptido no modificado.

Una secuencia homóloga de conformidad con la presente invención, puede ser una secuencia la cual existe en otras especies de Camelidae tal como, por ejemplo, camello, dromedario, llama, alpaca, guanaco, etc.

En donde la secuencia homóloga indica identidad de secuencia, significa una secuencia la cual presenta una identidad de secuencia mayor (más de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de identidad de secuencia) con la secuencia original y es preferiblemente caracterizada por propiedades similares de la secuencia original, concretamente afinidad, la identidad calculada usando métodos conocidos.

Alternativamente, una secuencia homóloga también puede

ser cualquier secuencia de aminoácido que resulta de las sustituciones permitidas en cualquier número de posiciones de la secuencia original de conformidad con la fórmula de abajo:

Ser sustituida por Ser, Thr, Gly y Asn;

Arg sustituida por uno de Arg, His, Gln, Lys y Glu;

Leu sustituida por uno de Leu, Ile, Phe, Tyr, Met y Val;

Pro sustituida por uno de Pro, Gly, Ala y Thr;

Thr sustituida por uno de Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His y Gln;

Ala sustituida por uno de Ala, Gly, Thr y Pro;

Val sustituida por uno de Val, Met, Tyr, Phe, Ile y Leu;

Gly sustituida por uno de Gly, Ala, Thr, Pro y Ser;

Ile sustituida por uno de Ile, Met, Tyr, Phe, Val y Leu;

Phe sustituida por uno de Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val y Leu;

Tyr sustituida por uno de Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val y Leu;

His sustituida por uno de His, Glu, Lys, Gln, Thr y Arg;

Gln sustituida por uno de Gln, Glu, Lys, Asn, His, Thr y Arg;

Asn sustituida por uno de Asn, Glu, Asp, Gln y Ser;

Lys sustituida por uno de Lys, Glu, Gln, His y Arg;

Asp sustituida por uno de Asp, Glu y Asn;

Glu sustituida por uno de Glu, Asp, Lys, Asn, Gln, His y Arg;

Met sustituida por uno de Met, Phe, Ile, Val, Leu y Tyr.

Una secuencia de nucleótido homóloga de conformidad con la presente invención se puede referir a secuencias de nucleótido de más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ó 1000 nucleótidos capaces de hibridizar al complemento inverso de la secuencia de nucleótido capaz de codificar la secuencia original, bajo condiciones de hibridización rigurosas (tal como las descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York).

Como se usa en este documento, la porción funcional se refiere a una secuencia de un nanocuerpo que de suficiente tamaño de forma tal que la interacción de interés es mantenida con afinidad de 1 x 10^{-6} M o mayor.

Alternativamente, una porción funcional comprende una supresión parcial de la secuencia de aminoácido completa y aún mantiene los sitios enlazantes y dominios de proteína necesarios para el enlace de e interacción con el objetivo.

Como se usa en este documento, una porción funcional se refiere a menos del 100% de la secuencia completa (por ejemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% etc.), pero comprende 5 o más aminoácidos o 15 o más nucleótidos.

Objetivos como se mencionan en este documento tal como TNF-alfa, receptor TNF-alfa, proteínas de suero (por ejemplo, albúmina de suero, inmunoglobulinas de suero, proteína que se enlaza a tiroxina, transferrina, fibrinógeno) e IFN-gama, receptor IFN-gama pueden ser fragmentos de los objetivos. Así un objetivo también es un fragmento del objetivo, capaz de provocar una respuesta inmune. Un objetivo es también un fragmento del

objetivo, capaz de enlazarse a un nanocuerpo planeado contra el objetivo de longitud completa.

Un fragmento como se usa en este documento, se refiere a menos del 100% de la secuencia (por ejemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, etc.) pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. Un fragmento es de longitud suficiente de forma tal que la interacción de interés se mantiene con afinidad de 1 x 10^{-6} M o mayor.

Un fragmento como se usa en este documento, se refiere a inserciones, supresiones y sustituciones opcionales de uno o más aminoácidos las cuales no alteran sustancialmente la capacidad del objetivo a enlazarse a un nanocuerpo planeado contra el objetivo de tipo nativo. El número de inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácido es preferiblemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70 aminoácidos.

Una secuencia homóloga de la presente invención puede incluir un polipéptido anti-THF-alfa el cual se ha humanizado. La humanización de anticuerpos de la nueva clase de V_{HH} podrá además reducir la posibilidad de reacción inmunología indeseada en un individuo humano de la administración.

Una modalidad de la presente invención, se refiere a un método para preparar péptidos modificados en base a anticuerpos llama, reduciendo los residuos de aminoácido del dominio variable de anticuerpo (V_{HH}), el cual puede ser modificado son disminuir

la afinidad nativa del dominio por antígeno y mientras se reduce su inmunogenicidad con respecto a especies heterólogas; el uso de V_{HH} que tienen modificaciones en los residuos identificados, las cuales son útiles para administración e especies heterólogas; y al V_{HH} así modificado.

Más específicamente, la invención se refiere a la preparación de V_{HH} modificados, los cuales son modificados por administración a humanos, los mismos V_{HH} resultantes, y el uso de tales V_{HH} "humanizados" en el tratamiento de enfermedades en humanos. Por humanizado significa mutado, para que en inmunogenicidad en administración a pacientes humanos es menor o no existente. Humanizando un polipéptido, de conformidad con la presente invención, comprende una etapa de reemplazar uno o más de los aminoácidos Camelidae por su contraparte humana, comprende una etapa de reemplazar uno o más de los aminoácidos Camelidae por su contraparte humana como se encuentra la secuencia consenso humana, son que el polipéptido pierda su carácter típico, es decir, la humanización no afecta significantemente la capacidad de enlace del antígeno del polipéptido resultante. Tales métodos son bien conocidos por destinatario experto.

La humanización de nanocuerpos Camelidae requieren la introducción y mutagénesis de una cantidad limita de aminoácidos en una cadena de polipéptido única. Esto es en contraste para humanización de scFv, Fab, (Fab)2 e IgG, los cuales requieren la introducción de cambios de aminoácido en dos cadenas, la cadena ligera y la pesada y la preservación del montaje de ambas cadenas.

Como se describe en el documento WO 04/041862, se puede humanizar nanocuerpo anti-TNF. La humanización puede por ejemplo

involucrar mutagénesis de residuos en FR1 en posición 1 y 5, los cuales se introducen por el cebador usado para el repertorio de clonación y no se origina de forma natural en la secuencia llama. La mutagénesis de aquellos residuos no resulta en pérdida actividad enlazante y/o inhibitoria. La humanización también puede involucrar mutagénesis de residuos en FR3 en posición 74, 76, 83, 84, 93. La mutagénesis de aquellos residuos no resulta en una pérdida dramática de actividad enlazante y/o inhibitoria. La combinación de mutaciones de FR1 y FR3 por lo tanto no afecta a la actividad enlazante o inhibitoria. La humanización también involucra mutagénesis de residuos en FR4 en posición 108. La mutagénesis de Q108L resulta en nivel de producción menor en *E. coli*. La posición 108 es solvente expuesto en V_{HH} Camélido, mientras en anticuerpos humanos esta posición es metida en la interface VH-VL (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). En VH aislados en posición 108 es solvente expuesto. La introducción de un Leu hidrofóbico no polar en lugar de Gln no cargado polar puede tener un efecto drástico en el plegado/estabilidad intrínseca de la molécula. También, el reemplazo de residuos hidrofílicos por residuos hidrofóbicos humanos en posiciones 44 y 45 (E44G y R45L), no tiene un efecto en enlace y/o inhibición. Sin embargo, se observó la pérdida de actividad enlazante y/o inhibición cuando se introduce F37V y F47W. Los datos de modelado confirman el residuo crítico 37 para preservar la integridad de la confirmación de bucle CDR3 y por lo tanto en actividad (toda la numeración de conformidad con el Kabat).

De acuerdo a una modalidad de la presente invención, la humanización involucra el reemplazo de cualquiera de los siguientes residuos ya sea solo o en combinación:

- FR1 en posición 1, 5, 28 y 30,
- el aminoácido marca en posición 44 y 45 en FR2,
- FR3 de residuos 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94,
- y en posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4;
- numeración de conformidad con la numeración Kabat.

Una modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa, o un ácido nucleico capaz de codificar el polipéptido para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos relacionados a procesos inflamatorios. TNF-alfa se involucra en procesos inflamatorios, y el bloqueo de acción de TNF-alfa puede tener un efecto anti-inflamatorio. TNF-alfa se involucra en procesos inflamatorios, y el bloqueo de acción TNF-alfa puede tener un efecto anti-inflamatorio, el cual es muy deseable en ciertos estados de enfermedad tal como, por ejemplo, enfermedad de Crohn. Los ejemplos demuestran que V_{HH} de conformidad con la invención, los cuales enlazan a TNF-alfa y sin embargo, bloquea su enlace al receptor TNF-alfa.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención se aplican a enfermedades autoinmunes, tales como enfermedad de Addison (adrenal), enfermedades autoinmunes del oído (oído), enfermedades autoinmunes del ojo (ojo), hepatitis autoinmunes (hígado), parotitis autoinmune (glándula paratiroides), enfermedad de Crohn (intestino), Diabetes tipo I (páncreas), epididimitis (epididimis), glomerulonefritis (riñón), enfermedad de Grave (tiroides), síndrome de Guillain-Barre (células nerviosas), enfermedad de Hashimoto (tiroides), anemia hemolítica (células sanguíneas rojas), lupus eritematoso sistémico (tejidos múltiples), infertilidad en machos (esperma), esclerosis múltiple

(células nerviosas), Myasthenia Gravis (articulaciones neuromuscular), Pénfigos (piel principalmente), Psoriasis (piel), fiebre reumática (corazón y articulaciones), artritis reumatoide (revestimiento de articulaciones), Sarcoidosis (tejidos y órganos múltiples), Escleroderma (piel y tejidos conectivos), síndrome de Sorben (glándulas exocrinas y otros tejidos), Espondilo artropatías (esqueleto axial y otros tejidos), tiroiditis (tiroides), vasculitis (vasos sanguíneos).

Dentro de paréntesis está el tejido afectado por la enfermedad. Este listado de enfermedades autoinmunes pretende ser ejemplar más que inclusivo.

Las condiciones autoinmunes para las cuales los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención son aplicables incluyen, por ejemplo, SIDA, alergia atópica, asma bronquial, eczema, lepra, esquizofrenia, depresión heredada, transplante de tejidos y órganos, síndrome de de fatiga crónica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, infarto al miocardio, apoplejía, autismo, epilepsia, fenómeno de Arthusm anafilaxis y adicción al alcohol y drogas. En las condiciones autoinmunes definidas anteriormente, el tejido afectado es el objetivo primario, en otros casos es el objetivo secundario. Estas condiciones son síndromes parcialmente o principalmente autoinmunes. Por lo tanto, en tratarlos, es posible el uso de los mismos métodos, o aspectos de los mismos métodos y que se describe en este documento, algunas veces en combinación con otros métodos.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa de conformidad con la invención, o un ácido nucleico capaz de codificar el polipéptido para la

preparación de un medicamento para tratar un trastorno que se relaciona a procesos inflamatorios. Ejemplos de trastornos incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple.

Polipéptidos y ácidos nucleicos que codifican a la presente invención pueden ser administrados a un sujeto por rutas convencionales, tal como intravenosamente, Sin embargo, una propiedad especial de los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención es que penetran barreras, tal como membranas de tejido y/o tumores que actúan localmente sobre este, y son suficientemente estables para resistir ambientes extremos, tal como en el estómago. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención que se relaciona al suministro de polipéptidos anti-TNF-alfa.

Cuando los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención se usan para, o se planean para uso en, la prevención o tratamiento de enfermedades y trastornos del tracto gastrointestinal, en particular por medios de administración oral u otra administración en el tracto gastrointestinal, no será usualmente necesario usar polipéptidos de la invención que tienen vida media incrementada en suero (es decir, que se han pegilado o que contienen un Nanocuerpo dirigido contra una proteína de suero). Así, para tales indicaciones, los polipéptidos de la invención se pueden usar que únicamente contienen Nanocuerpos de la invención. En particular, se ha encontrado que para administración oral para la prevención y tratamiento de enfermedades o trastornos del tracto gastro-intestinal asociados con y/o mediados por TNF-alfa (tal como IBD y otras enfermedades

y trastornos del tracto gastro-intestinal mencionado anteriormente), puede ser preferido el uso de un Nanocuerpo monovalente de la invención o de un polipéptido de la invención que esencialmente consiste de un Nanocuerpo monovalente de la invención. Para otras indicaciones, tal como tratamiento de artritis reumatoide (RA), se puede preferir el uso de un Nanocuerpo bivalente de la invención. Cuando tal Nanocuerpo alcanza su sitio planeado de acción vía la corriente sanguínea, se pude preferir el uso de un polipéptido de la invención es que incrementa su vida media en suero.

Un sujeto de conformidad con la invención puede ser cualquier mamífero susceptible a tratamiento por polipéptidos terapéuticos.

El suministro terapéutico de polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención, resulta en la provisión de tales moléculas en una forma activa en el colon en sitios locales que son afectados por el trastorno. Estos sitios pueden estar muy inflamados y contienen células que producen TNF-alfa. Los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención, los cuales se unen a TNF-alfa pueden neutralizar el TNF-alfa localmente, evitando la distribución a través del cuerpo completo y así limitando los efectos colaterales negativos. Microorganismos genéticamente modificados tal como Micrococos lactis son capaces para secretar anticuerpos o porciones funcionales del mismo. Tales microorganismos modificados se pueden usar como vehículos para producción local y suministro de anticuerpos o porciones funcionales del mismo en el intestino. Usando una cepa la cual produce un polipéptido anti-TNF-alfa, se puede tratar el síndrome del intestino inflamado.

Otro aspecto de la invención involucra polipéptidos anti-TNF suministrados, usando expresión de superficie en o secreción de bacteria no invasiva, tal como organismos hospedantes Gram positivos similares a Lactococcus spec., usando un vector tal como se describe en el documento WO02/23471.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través del ambiente gástrico sin que la sustancia sea inactivada.

Ejemplos de trastornos son cualquiera que provoca inflamación, que incluyen pero no se limitan a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiples. Como se conoce por persona expertas en la técnica, una vez en posesión del constructo de polipéptido, se puede aplicar tecnología de formulación para liberar una cantidad máxima de polipéptido en la ubicación derecha (en el estómago, en el colon, etc.). Este método de suministro es importante para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos cuyos objetivos se localizan en el sistema del intestino.

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno susceptible para modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través del ambiente gástrico sin ser inactivado, por administración oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF alfa como se describe en este documento.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un

polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles para modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través del ambiente gástrico sin ser inactivado.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención al sistema del intestino, sin que la sustancia sea inactivada, por administración oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Un aspecto de la invención es un método para suministro de un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la corriente sanguínea de un sujeto son que la sustancia sea inactivada, por administración oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas o trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado al tracto vaginal y/o rectal.

Ejemplos de trastornos son cualquiera que causa inflamación, que incluyendo, pero no se limita a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple. En un ejemplo no limitante, una formulación de conformidad con la invención, comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, en la forma de un gel, crema, supositorio, película o en la forma de una esponja o un anillo vaginal que disminuye la liberación del ingrediente activo durante un tiempo (tales formulaciones se describe en los documentos EP 707473, EP 684814, US 5629001).

406

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado al tracto vaginal o rectal, administrando vaginalmente y/o rectalmente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado al tracto vaginal y/o rectal.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención al tracto vaginal y/o rectal sin ser la sustancia inactivada, administrando al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la corriente sanguínea de un sujeto son ser la sustancia inactivada, administrando al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Otra modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado a la nariz, tracto respiratorio superior y/o pulmón.

Ejemplos de trastornos son cualquiera que provoca

inflamación, que incluye, pero no se limita a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple. En un ejemplo no limitante, una formulación de conformidad con la invención, comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento en la forma de una atomizador nasal (por ejemplo, aerosol), o inhalador. Ya que el constructo de polipéptido es pequeño, puede alcanzar su objetivo mucho más efectivamente que las moléculas IgG terapéuticas.

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, suministrado al tracto respiratorio superior y/o pulmón, administrando a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa, como se describe en este documento, por inhalación a través de la boca o nariz.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado a la nariz, tracto respiratorio superior y/o pulmón, sin que el polipéptido sea inactivado.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la nariz, tracto respiratorio superior y pulmón sin activación, administrando a la nariz, tracto respiratorio superior y/o pulmón a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la corriente sanguínea de un sujeto sin activación, administrando a la nariz, tracto respiratorio superior y/o pulmón de un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Una modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado a la mucosa intestinal, en donde el trastorno incrementa la permeabilidad de la mucosa intestinal. Porque si tamaño pequeño, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, puede pasar a través de la mucosa intestinal y alcanza la corriente sanguínea más eficientemente en sujetos que sufren de trastornos los cuales causan un incremento en la permeabilidad de la mucosa intestinal, por ejemplo enfermedad de Crohn.

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado a la mucosa intestinal, en donde tal trastorno incrementa la permeabilidad de la mucosa intestinal, administración oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Este proceso puede aún ser mejorado por un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activo. En este aspecto de la invención, V_{HH} es fusionado a un portador que mejora la transferencia a través de la pared intestinal en la corriente sanguínea. En un ejemplo no

limitante, este "portador" es un segundo V_{HH} el cual se fusiona al V_{HH} terapéutico. Tal constructo de fusión de hace usando métodos conocidos en la técnica. El "portador" V_{HH} se une específicamente a un receptor en la pared intestinal el cual conduce una transferencia activa a través de la pared.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención suministrado a la mucosa intestinal, en donde el trastorno incrementa la permeabilidad de la mucosa intestinal.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la mucosa intestinal, sin ser inactivado, administrando oralmente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa de la invención.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la corriente sanguínea de un sujeto son ser inactivada, administrando oralmente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa de la invención.

Este proceso puede ser aún además mejorado por un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activo. En este aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento es fusionado a un portador que mejora la transferencia a través de la pared intestinal en la corriente sanguínea. En un ejemplo no limitante, este "portador" es un V_{HH} el cual se fusiona con el polipéptido. Tales constructos de fusión se hacen usando métodos

conocidos en la técnica. El "portador" V_{HH} se enlaza específicamente a un receptor en la pared intestinal, la cual induce una transferencia activa a través de la pared.

Una modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través de los tejidos abajo de la lengua efectivamente.

Ejemplos de trastornos son cualquiera que causan inflamación, que incluyen, pero no se limitan a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple. Una formulación del constructo del péptido como se describe en este documento, por ejemplo, una tableta, un atomizador, una gota se coloca bajo la lengua y se adsorbe a través de las membranas de mucosa en la red capilar bajo la lengua.

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través de tejidos abajo de la lengua efectivamente, por administración sublingualmente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través de los tejidos abajo de la lengua.

411

Un aspecto de la invención es un método para suministro de un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a los tejidos debajo de la lengua son ser inactivado, administrando sublingualmente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la corriente sanguínea de un sujeto son ser inactivado, administrando oralmente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Una modalidad de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través de la piel efectivamente.

Ejemplos de trastornos son cualquiera que causan inflamación, que incluyen, pero no se limitan a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamado y esclerosis múltiple. Una formulación del constructo de polipéptido, por ejemplo, una crema, película, atomizador, gota, parche, se coloca en la piel y pasa a través de esta.

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, el cual es capaz de pasar a través de la piel efectivamente, administrando tópicamente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención el cual es capaz de pasar a través de la piel efectivamente.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la piel sin ser inactivado, administrando tópicamente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

Un aspecto de la invención es un método para suministrar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la corriente sanguínea de un sujeto, administrando tópicamente a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento.

En otra modalidad de la presente invención, un polipéptido anti-TNF-alfa además comprende un nanocuerpo portador (por ejemplo, V_{HH}), el cual actúa como un portador de transporte activo para transportar el polipéptido anti-TNF-alfa, a partir del lumen de pulmón a la sangre.

Un polipéptido anti-TNF-alfa además comprende un portador enlazado específicamente a un receptor presente en la superficie de la mucosa (células epiteliales bronquiales) que resulta en el transporte activo del polipéptido del lumen del pulmón a la sangre. El nanocuerpo portador puede ser fusionado al constructo del polipéptido. Tales constructos de fusión se pueden hacer usando métodos conocidos en la técnica y se describen en este documento. El nanocuerpo "portador" se enlaza específicamente a un receptor en la superficie de la mucosa, la

413

cual induce una transferencia activa a través de la superficie.

Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar los anticuerpos (por ejemplo, V_{HH}) son activamente transportado en la corriente sanguínea en administración nasal. Similarmente, una biblioteca del fago V_{HH} nativo o inmune se puede administrar nasalmente, y después de puntos de tiempo diferente después de la administración, sangre y órganos se pueden aislar para rescatar fagos que son activamente transportados en la corriente sanguínea. Un ejemplo no limitante de un receptor para transporte activo del lumen de pulmón a la corriente sanguínea es el receptor Fc (FcRn). Un aspecto de la invención incluye las moléculas V_{HH} identificadas por el método. Tal V_{HH} puede después ser usado como un portador V_{HH} para el suministro de un V_{HH} terapéutico al objetivo correspondiente en la corriente sanguínea en administración nasal.

En un aspecto de la invención, uno puede usar un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en este documento, para modular los agentes que modula el enlace del péptido a TNF-alfa. Cuando se identifica en un ensayo que mide el enlace o solo el desplazamiento solo, agentes que pueden ser sometidos a pruebas funcionales para determinar sin modulan la acción del antígeno in vivo.

En un ejemplo de un experimento de desplazamiento, fago o células que expresan TNF-alfa o un fragmento del mismo, se inoculan en amortiguador enlazante con polipéptido de la invención, el cual se ha etiquetado, en la presencia o ausencia de concentraciones incrementadas de un modulador candidato. Para validar y calibrar el ensayo, se pueden realizar reacciones de competición control usando concentraciones incrementadas del

polipéptido y el cual no es etiquetado. Después de la incubación, las células se lavan extensivamente, y se unen, el polipéptido etiquetado se mide apropiadamente para la etiqueta proporcionada (por ejemplo, conteo de escintilación, fluorescencia, etc.). Una disminución de al menos 10% en la cantidad del polipéptido etiquetado enlazado en la presencia del modular candidato, indica desplazamiento de enlace por el modular candidato. Los moduladores candidatos se consideran enlazar específicamente en este u otros ensayos descritos en este documento si se desplazan al 50% de polipéptido etiquetado (dosis del polipéptido sub-saturado) a una concentración de 1 μM o menos.

Alternativamente, el enlace o desplazamiento del enlace se puede monitorear por superficie de plasmón de superficie (SPR). Se pueden usar ensayos de resonancia de plasmón de superficie como un método cuantitativo para enlazarse entre dos moléculas por el cambio en masa casi un sensor inmovilizado causado por el enlace o pérdida de enlace del polipéptido de la invención de la fase acuosa para TNF-alfa inmovilizado en una membrana en el sensor. Este cambio de masa se mide como unidades de resonancia contra tiempo, después de la inyección o remoción del polipéptido o modulador candidato y se mide usando un Biosensor Biacore (Biacore AB). TNF-alfa puede ser por ejemplo inmovilizado en un chip sensor (por ejemplo, chip CM5 grado de investigación; Biacore AB) en una membrana de lípido de película delgada de conformidad con métodos descritos por Salamon et al., (Salamon et al., 1996, Biophys J. 71: 283-294; Salamon et al., 2001, Biophys. J. 80: 1557-1567; Salamon et al., 1999, Trends Biochem. Sci. 24: 213-219, cada uno de los cuales se incorpora en este documento por referencia). Sarrio et al., demuestra que se

puede usar SPR para detectar ligandos enlazado el receptor de adenosina GPCR A(1) inmovilizado en una capa de lípido en el chip (Sarrio et al., 2001, Mol. Cell. Biol. 20: 5164-5174, incorporado en este documento por referencia). Las condiciones para en enlace de un polipéptido de la invención a TNF-alfa en un ensayo SPR puede ser sintonizado finamente por un experto en la técnica usando las condiciones reportadas por Sarrio et al., como un punto de partida.

El SPR se puede someter a ensayo por moduladores de enlace en al menos dos vías. Primero, un polipéptido de la invención puede ser pre-enlazado para inmovilizar TNF-alfa, seguido por inyección del modulador candidato a una concentración que varía de 0.1 nM a 1 µM. El desplazamiento del polipéptido enlazado se puede cuantificar, permitiendo detecciones del enlace del modulador. Alternativamente, el TNF-alfa enlazado a la membrana puede ser pre-incubada con un modulador candidato y cambiado en el polipéptido de la invención. Una diferencia en afinidad de enlace entre el polipéptido y TNF-alfa pre-incubado con el modulador, comparado entre el polipéptido y TNF-alfa en ausencia del modulador demostrará enlace o desplazamiento del polipéptido en la presencia del modulador. En cualquier ensayo, una disminución del 10% o más en la cantidad del enlace del polipéptido en la presencia del modulador candidato, en relación a la cantidad del enlace de polipéptido en la ausencia del modulador candidato indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y el polipéptido.

Otro método para detectar la inhibición del enlace de, por ejemplo, un polipéptido de la invención, para TNF-alfa que usa transferencia de energía de resonancia de fluorescencia

(FRET). FRET es un fenómeno mecánico quantum que ocurre entre un donador de fluorescencia (D) y un aceptor fluorescente (A) en proximidad cerrada entre sí (usualmente < 100 Å de separación) si el espectro de emisión de traslapes D con el espectro de excitación de A. Las moléculas a ser probadas, por ejemplo, un polipéptido de la invención y un TNF-alfa se etiquetan con un par complementario del donador y fluoróforos aceptables. Mientras cercanamente enlazado junto con el TNF-alfa: polipéptido de interacción, la fluorescencia emitida en excitación del donador de fluoróforo, podrá tener una longitud de onda diferente de la emitida en respuesta a que la longitud de onda de excitación cuando el polipéptido y TNF-alfa no se enlazan, proporcionado para cuantificación de moléculas enlazadas contra no enlazadas por medición de intensidad de emisión en cada longitud de onda. Los fluoróforos donadores con los cuales se etiqueta el TNF-alfa son bien conocidos en la técnica. De interés particular son variantes de A. Se conoce GFP victoria como Cian FP (CFP, Donador (D)) y Amarillo FP (YFP, Aceptor (A)). Como un ejemplo, la variante YFP se puede hacer como una proteína de fusión con TNF-alfa. Vectores para la expresión de variantes GFP como fusiones (Clontech), así como reactivos etiquetados con fluoróforo (Molecular Probes) se conoce en la técnica. La adición de un modulador candidato a la mezcla de polipéptido etiquetado fluorescentemente y YFP-TNF-alfa resultará en una inhibición de evidencia de transferencia de energía, por ejemplo, una enfermedad en fluorescencia en relación a una muestra sin el modulador candidato. En un ensayo usando FRET para la detección de interacción TNF-alfa:polipéptido, un 10% o mayor disminución en la intensidad de emisión fluorescente en la longitud de onda

aceptora en muestras que contienen un modulador candidato, en relación a muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa:polipéptido.

Una muestra como se usa en este documento puede ser una muestra biológica que contiene TNF-alfa tal como clínico (por ejemplo, fracciones celulares, sangre completa, plasma, suero, tejido, células, etc.), derivado de muestras clínicas, agricultura, forense, investigación u otra posible. Las muestras clínicas pueden ser de origen humano o animal. La muestra analizada puede ser tanto sólida como líquida en naturaleza. Es evidente cuando se usan materiales sólidos, estos son primero disueltos en una solución adecuada.

Una variación en FRET usa apagado fluorescente para interacciones moleculares menores. Una molécula en el par que interactúa puede ser etiquetado con un fluoróforo, y el otro una molécula que apaga la fluorescencia del fluoróforo cuando en aposición cerrada con el. Un cambio en fluorescencia en excitación es indicativo de un cambio en la asociación de las moléculas etiquetadas con el par fluoróforo:apagador. Generalmente, un incremento en fluorescencia del TNF-alfa etiquetado es indicativo que el polipéptido anti-TNF-alfa que porta el apagador se ha desplazado. Para ensayos de apagado, un 10% o mayor incremento en la intensidad de emisión fluorescente en muestras que contienen un modulador candidato, en relación a muestras son el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de polipéptido TNF-alfa:anti-TNF-alfa.

Además a la resonancia de plasmon de superficie y

métodos FRET, se utiliza la medición de polarización fluorescente para cuantificar en enlace. El valor de polarización fluorescente para una molécula etiquetada fluorescentemente depende en el tiempo de correlación rotacional o velocidad movimiento de rotación. Complejos, tal como aquellos formados por TNF-alfa en asociación con un polipéptido anti-TNF-alfa fluorescentemente etiquetado, tiene valores de polarización mayor que el polipéptido etiquetado, no sometido a complejo. La inclusión de un inhibidor candidato de la interacción de polipéptido THF-alfa:anti-TNF-alfa resulta en una disminución en polarización fluorescente, en relación a una mezcla sin el inhibidor candidato, si el inhibidor candidato afecta o inhibe la interacción de TNF-alfa con el polipéptido. La polarización fluorescente es bien adecuada para identificación de moléculas pequeñas que afectan la formación de complejos de polipéptido TNF-alfa:anti-TNF-alfa. Una disminución del 10% o más en polarización fluorescente en muestras que contienen un modulador candidato, en relación a polarización fluorescente en una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de polipéptido TNF-alfa:anti-TNF-alfa.

Otra alternativa para monitorear interacciones de polipéptido TNF-alfa:anti-TNF-alfa usa un ensayo biosensor. Se han descrito biosensores ICS en la técnica (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; Cornell B, Braach-Maksvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek L, y Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" Nature 1997, 387, 580). En esta tecnología, la asociación de TNF-alfa y un polipéptido anti-TNF-alfa se acopla al cierre de canales de ión facilitado de

gramicidina en bicapas de membrana suspendida y así a un cambio medible en la admisión (similar a la impedancia) del biosensor. Esta propuesta es lineal sobre seis ordenes de magnitud de cambio de admisión y es idealmente adecuada para escala mayor, selección de mayor procedimiento de bibliotecas de combinación de molécula pequeña. Un cambio del 10% o mayor (incremento o disminución) en admisión en una muestra que contiene un modulador candidato, en relación a la admisión de una muestra que carece el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y el polipéptido. Es importante notar que en ensayos para probar la interacción de TNF-alfa con un polipéptido anti-TNF-alfa, es posible que un modulador de interacción no necesita necesariamente interactuar directamente con los dominios de las proteínas que interactúan físicamente con el polipéptido. También es posible que un modulador podrá interactuar en una ubicación removida del sitio de interacción y causa, por ejemplo, un cambio conformacional en el TNF-alfa. Moduladores (inhibidores o agonistas) que actúan en esta manera son no obstante de interés como agentes para modular el enlace de TNF-alfa a su receptor.

Cualquiera de los ensayos de enlace descritos se pueden usar para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que se enlaza a TNF-alfa, o que afecta el enlace de, por ejemplo, un polipéptido de la invención al TNF-alfa. Se hace reaccionar un TNF-alfa con el polipéptido en la presencia o ausencia de la muestra, y se mide el enlace del polipéptido como apropiado para el ensayo de enlace siendo usado. Una disminución del 10% o más en el enlace del polipéptido indica que la muestra contiene un agente que modula

420

en enlace del polipéptido al TNF-alfa. Por supuesto, el método anteriormente generalizado puede fácilmente aplicado para seleccionar los moduladores candidatos los cuales alteran el enlace entre cualquier polipéptido anti-TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo, y TNF-alfa o un fragmento del mismo.

Una modalidad de la presente invención es un agente desconocido identificado por el método descrito en este documento.

Una modalidad de la presente invención es un agente desconocido identificado por el método descrito en este documento para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos relacionados de procesos inflamatorios.

Otra modalidad de la presente invención es un uso de un agente desconocido identificado por el método descrito en este documento para uso en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos relacionados a un proceso inflamatorio.

Ejemplos de trastornos incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple.

Una célula que es útil de conformidad con la invención es preferiblemente seleccionada del grupo que consiste de células bacterianas tal como, por ejemplo, *E. coli*, células de levadura tal como, por ejemplo, S. cerevisae, P. pastoris, células de insecto o células de mamífero.

Una célula que es útil de conformidad con la invención puede ser cualquier célula en la cual una secuencia de ácido

nucleico que codifica un polipéptido comprende un TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo, de conformidad con la invención se puede introducir de forma tal que el polipéptido se expresa en niveles naturales o abajo de niveles naturales, como se define en este documento. Preferiblemente, un polipéptido de la invención que se expresa en una célula que exhibe farmacología normal o casi normal, como se define en este documento.

De acuerdo a una modalidad preferida de la presente invención, una célula se selecciona del grupo que consiste de células COS7, una célula CHO, una célula LM (TK-), una célula NIH-3T3, célula HEK-293, célula K-562 o una célula astrocitoma 1321N1 pero también otras líneas celulares transfectables.

En general, "cantidad terapéuticamente efectiva", "dosis terapéuticamente efectiva" y "cantidad efectiva" significa la cantidad necesaria para lograr el resultado o resultados deseados (modulación del enlace TNF-alfa; tratamiento o prevención de inflamación). Un experto de experiencia ordinaria en la técnica, reconocerá que la potencia y, por lo tanto, una "cantidad efectiva" puede variar por los compuestos variados que modulan en enlace TNF-alfa usando en la invención. Un experto en la técnica puede fácilmente valorar la potencia del compuesto.

Como se usa en este documento, el término "compuesto" se refiere a un polipéptido anti-TNF-alfa de la presente invención, una composición, o un ácido nucleico capaz de codificar el polipéptido o un agente identificado de conformidad con el método seleccionado descrito en este documento o el polipéptido comprende uno o más aminoácidos derivatizados.

422

Por "farmacéuticamente aceptable" significa un material que no es biológicamente o de otra forma indeseable, es decir, el material puede ser administrado a un individuo junto con el compuesto sin causar cualquier efecto biológico indeseable o que interactúa en una manera nociva con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la cual se contiene.

Polipéptidos anti-TNF-alfa como se describen en este documento son útiles para tratar o prevenir condiciones en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto o composición.

Polipéptidos anti-TNF de la presente invención son útiles para tratar o prevenir condiciones que se relacionan a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto o composición que enlaza TNF-alfa.

Polipéptidos anti-TNF alfa como se describe en este documento, son útiles para tratar o prevenir condiciones en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de una combinación de compuesto con otra, tal como, por ejemplo, aspirina.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa como se describe en este documento, son útiles para tratar o prevenir condiciones que se relacionan a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatoria y esclerosis múltiple en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de una combinación de compuesto con otra, tal como, por ejemplo, aspirina.

La presente invención no se limita a la administración de formulaciones que comprenden un compuesto único de la invención. Es dentro del alcance de la invención para proporcionar combinación de tratamientos en donde una formulación es administrada a un paciente en necesidad del mismo que comprende más de un compuesto de la invención.

Condiciones mediadas por TNF-alfa incluyen, pero no se limitan a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio y esclerosis múltiple.

Un compuesto útil en la presente invención puede ser formulado como composiciones farmacéuticas y administrado a un hospedante de mamífero, tal como un paciente humano o un animal doméstico en una variedad de formas adaptadas a la ruta escogida de administración, es decir, oralmente o parenteralmente, intranasalmente por inhalación, intravenosa, intramuscular, tópica o rutas subcutáneas.

Un compuesto de la presente invención puede también ser administrado usando métodos de terapia del gen de suministro. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,399,346, la cual se incorpora por referencia en su totalidad. Usando un método de terapia del gen de suministro, células primarias transfectadas con el gen para el compuesto de la presente invención pueden adicionalmente ser transfectadas con promotores específicos del tejido a órganos, tejido, injerto, tumores o células específicas objetivo.

Así, el compuesto presente puede ser administrado sistémicamente, por ejemplo, oralmente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte

o un portador comestible asimilable. Pueden ser adjuntados en cápsulas de gelatina dura o suave, pueden ser comprimidos en tabletas, o pueden ser incorporados directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ser combinado con uno o más excipientes y se usan en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 0.1% del compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, ser variado y puede convenientemente ser entre aproximadamente 2 hasta aproximadamente 60% del peso de una forma de dosificación unitaria proporcionada. La cantidad del compuesto activo en tal composición terapéuticamente útil es de forma tal que se obtendrá el nivel de dosificación efectivo.

Las tabletas, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener los siguiente: también se pueden agregar aglutinantes tales como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicalcio; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de para, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente endulzantes tal como sacarosa, fructuosa, lactosa aspartame o un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria, o saborizante de cereza. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener además al material del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilen glicol. Otros materiales variados pueden estar presentes como revestimientos o para de otra forma modificar la forma física de la forma de dosificación unitaria

sólida. Por ejemplo, tabletas, píldoras o cápsulas pueden ser revestidas con gelatina, cera, laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructuosa como un agente edulcorante, metilo y propilparabenos tal como preservativos, un tinte y saborizante tal como sabor cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede ser incorporado en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo también se administra intravenosamente o intraperitonealmente por infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezclado con un tensoactivo no tóxico. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilen glicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenaje y uso, estas preparaciones contienen un preservativo para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo los cuales se adaptan para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsulados en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación última debe ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de manufactura y almacenaje. El portador líquido o vehículo puede ser un solvente

o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, polietilen glicoles líquidos y similares), aceites vegetales, gliceril ésteres no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por la formación de liposomas, por el mantenimiento de tamaño de partículas requeridas en el caso de dispersiones o por el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser causado aproximadamente por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azucares, amortiguadores o cloruro de sodio. Se puede provocar la absorción prolongada de las composiciones inyectables aproximadamente por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como sea requeridos, seguido por esterilización por filtrado. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y las técnicas de secado por congelamiento, las cuales proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones filtradas previamente esterilizadas.

Para administración tópica, el compuesto presente puede ser aplicado en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, será generalmente deseable administrarlos a la piel como

composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, el cual puede ser un sólido o un líquido.

Portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tal como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxialquilos o glicoles o mezclas agua-alcohol/glicol, en las cuales el compuesto presente se puede disolver o dispersar en niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensoactivos no tóxicos. Se pueden agregar adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso proporcionado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar a partir de almohadillas absorbentes, usadas para impregnar vendajes y otras telas, o rociando en el área afectada usando rociadores tipo bomba o en aerosol.

Espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales de ácido graso y ésteres, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales de mineral modificados también se pueden emplear con portadores líquidos para formar pastas para untar, geles, ungüentos, jabones y similares, para aplicación directamente a la piel del usuario.

Ejemplos de composiciones dermatológicas útiles las cuales se pueden usar para suministrar el compuesto a la piel se conoce en la técnica; por ejemplo, véase Jacquet et al., (Patente Estadounidense No. 4,608,392), Geria (Patente Estadounidense No. 4,992,478), Smith et al. (Patente Estadounidense No. 4,559,157) y Wortzman (Patente Estadounidense No. 4,820,508).

Dosificaciones útiles del compuesto se pueden

determinar comparando su actividad in vitro, y actividad in vivo en modelos animales. Métodos para la extrapolación de dosificaciones efectivas en ratones y otros animales, a humanos se conoce en la técnica; por ejemplo, véase la Patente Estadounidense No. 4,938,949.

Generalmente, la concentración de los compuestos en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente 0.1-25% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0.5-10% en peso. La concentración en una composición semi-sólida o sólida tal como un gel o un polvo será aproximadamente 0.1-5% en peso, preferiblemente aproximadamente 0.5-2.5% en peso.

La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, requerida para uso en tratamiento, variará no únicamente con la sal particular seleccionada pero también con la ruta de administración, la naturaleza de la condición a ser tratada y la edad y condición del paciente y será en última instancia en la discreción del médico o especialista que atiende. También la dosificación del compuesto varia dependiendo de la célula objetivo, tumor, tejido, injerto u órgano.

La dosis deseada puede convenientemente ser presentada en una dosis única o como dosis dividida administrada en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más sub-dosis por día. La sub-dosis puede además ser dividida, por ejemplo, en un número de administraciones especiadas con discreta holgura; tal como inhalaciones múltiples de un soplador o por aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

Un régimen de administración puede incluir tratamiento diario de acción prolongada. Por "acción prolongada" significa al menos dos semanas y preferiblemente, varias semanas, meses o años

de duración. Se pueden determinar modificaciones necesarias en esta intervalo de dosificación por un experto ordinario en la técnica, usando únicamente experimentación de rutina proporcionada en las enseñanzas en este documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también se puede ajustar por el médico individual en el evento de cualquier complicación.

La invención proporcionada para un agente que es un modulador de interacciones del receptor TNF-alfa/TNF-alfa.

El agente candidato puede ser un agente sintético, o una mezcla de agentes, o puede ser un producto natural (por ejemplo, un extracto de planta o cultivo sobrenadante). Un agente candidato de conformidad con la invención incluye una molécula pequeña que puede ser sintetizada, un extracto natural, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.

Se pueden seleccionar agentes moduladores candidatos de bibliotecas grandes de agentes sintéticos o naturales. Numerosos medios son actualmente usados para síntesis directa y al azar de agentes en base a sacárido, péptido y ácido nucleico. Bibliotecas de agente sintético están comercialmente disponibles de un número de compañías que incluyen Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH) y Microsource (New Milford, CT). Una rara biblioteca química está disponible de Aldrich (Milwauke, WI). Bibliotecas combinatorias están disponibles y se pueden preparar. Alternativamente, las bibliotecas de agentes naturales en la forma de extractos de bacteria, hongo, planta y animal están disponibles de por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) o

MycoSearch (NC), o son fácilmente producibles por métodos bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, bibliotecas y agentes producidos natural y sintéticamente son fácilmente modificados a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

Agentes útiles se pueden encontrar dentro de numerosas clases químicas. Agentes útiles pueden ser agentes orgánicos o agentes orgánicos pequeños. Agentes orgánicos pequeños tienen un peso molecular de más de 50 aún más de aproximadamente 2,500 daltons, preferiblemente menos de aproximadamente 750, más preferiblemente menos de aproximadamente 350 daltons. Clases ejemplares incluyen heterocitos, péptidos, sacáridos, esteroides y similares. Los agentes se pueden modificar para mejorar la eficacia, estabilidad, compatibilidad farmacéutica y similares. Se puede usar la identificación estructural de un agente para identificar, generar o seleccionar agentes adicionales. Por ejemplo, en donde los agentes del péptido se identifican, pueden ser modificados en una variedad de vías para mejorar su estabilidad, tal como usando un aminoácido no natural, tal como aminoácido D, particularmente alanina D, funcionalizando el amino o términos carboxílicos, por ejemplo, para el grupo amino, acilación o alquilación y para el grupo carboxilo, esterificación o amidificación o similares.

Para selección primaria, una concentración útiles de un agente candidato de conformidad con la invención se de aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100 µM o más (es decir, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M, etc.). La concentración de selección primaria será usada como un límite superior, a lo largo con nueve concentraciones adicionales, en donde las concentraciones adicionales se determinan reduciendo la

concentración de selección primaria en intervalos diarios medios (por ejemplo, por 9 concentraciones más) para selecciones secundarias o para generar curvas de concentración.

Un kit se selección para procesamiento mayor de conformidad con la invención, comprende todos los medios necesarios y medios para realizar la detección de un agente que modula interacciones del receptor TNF-alfa/TNF-alfa, interactuando con TNF-alfa en la presencia de un polipéptido, preferiblemente a una concentración en el intervalo de 1 µM a 1 mM.

El kit comprende lo siguiente: Células recombinantes de la invención, que comprenden y expresan la secuencia de nucleótido que codifica TNF-alfa, el cual se hace crecer de conformidad con el kit en un soporte sólido, tal como una placa de microtitulador, más preferiblemente una placa de microtitulador de 96 cavidades, de conformidad a métodos bien conocidos en la persona experta en la técnica, especialmente como se describe en el documento WO 00/02045. Alternativamente TNF-alfa se proporciona en una forma purificada para ser inmovilizado en, por ejemplo, una placa de microtitulador de 96 cavidades por la persona experta en la técnica. Alternativamente TNF-alfa se proporciona en el kit pre-inmovilizado en, por ejemplo, una placa de microtitulador de 96 cavidades. El TNF-alfa puede ser TNF-alfa completo o un fragmento del mismo.

Agentes moduladores de conformidad con la invención, en concentraciones de aproximadamente 1 µM hasta 1 mM o más, se agregan a las paredes definidas en la presencia de una concentración apropiada de polipéptido anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o

una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo, dicha concentración del polipéptido preferiblemente en el intervalo de 1 µM hasta 1 mM. Kits que contienen uno o más polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención.

Ensayos de enlace se realizan de conformidad con los métodos ya descritos en este documento y los resultados se comparan al nivel de línea base de, por ejemplo, TNF-alfa enlazado a un polipéptido anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo, pero en la ausencia de agente modulador agregado. Cavidades que muestran al menos 2 pliegues, preferiblemente 5 pliegues, más preferiblemente 10 pliegues y más preferiblemente 100 pliegues o más incrementados o disminuidos en enlace polipéptido TNF-alfa (por ejemplo) comparado al nivel de actividad en la ausencia del modulador, se seleccionan para análisis adicional.

La invención proporciona otros kits útiles para selección de moduladores del enlace del receptor TNF-alfa/TNF-alfa, así como kits útiles para diagnosis de trastornos caracterizado por disfunción de TNF-alfa. La invención también proporciona kits útiles para seleccionar moduladores de trastornos, así como kits para su diagnosis, los trastornos se caracterizan por uno o más procesos que involucran TNF-alfa. Kits útiles de conformidad con la invención pueden incluir un TNF-aislado. Alternativamente, o en adición, un kit puede comprender células transformadas para expresar TNF-alfa. En una modalidad adicional, un kit de conformidad con la invención, puede comprender un polinucleótido que codifica TNF-alfa. En aún una modalidad adicional, un kit de conformidad con la invención puede

comprender los cebadores específicos útiles para amplificación de TNF-alfa. Los kits útiles de conformidad con la invención pueden comprender un polipéptido TNF-alfa aislado, un homólogo del mismo, o una porción funcional del mismo. Un kit de conformidad con la invención puede comprende células transformadas para expresar el polipéptido. Los kits pueden contener más de un polipéptido. En una modalidad adicional, un kit de conformidad con la invención comprende un polinucleótido que codifica el TMF-alfa. En aún una modalidad adicional, un kit de conformidad con la invención puede comprender los cebadores específicos útiles para amplificación de una macromolécula tal como, por ejemplo, TNF-alfa. Todos los kits de conformidad con la invención comprenderán los artículos de estado o combinaciones de artículos y envasado de materiales de los mismos. Los kits también incluirán instrucciones para uso.

Además, será claro a una persona experta que puede ser posible "injertar" uno o más de los CDR mencionados anteriormente para los Nanocuerpos de la invención en otros "andamiajes", que incluye pero no se limita a andamiaje humano c andamiaje no se inmunoglobulina. Andamiaje adecuado y técnicas para el injerto CDR serán claros a la persona experta y son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo, los documentos US-A-7,180,370, WO 01/27160, EP 0 605 522, EP 0 460 167, US-A-7,054,297, Nicaise et al., Protein Science (2004), 13:1882-1891; Ewert et al., Methods, 2004 Oct; 34(2):184-199; Kettleborough et al., Protein Eng. 1991 Oct; 4(7): 773-783; O'Brien and Jones, Methods Mol. Biol. 2003: 207: 81-100, y Skerra, J. Mol. Recognit. 2000: 13: 167-187 y Saerens et al., J. Mol. Biol. 2005 Sep 23; 352(3): 597-607, y las referencias adicionales citadas en este documento. Por ejemplo,

las técnicas conocidas per se para injertar CDR de rata o ratón en estructuras y andamiajes humanos se puede usar de una manera análoga para proporcionar proteínas quiméricas que comprenden uno o más de los CDR de los Nanocuerpos de la invención y una regiones de estructura humana o secuencias.

Así, en otra modalidad, la invención comprende un polipéptido quimérico que comprende al menos una secuencia CDR escogida del grupo que consiste de secuencias CDR1, secuencias CDR2 y secuencias CDR3 mencionadas en este documento para los Nanocuerpos de la invención. Preferiblemente, tal polipéptido quimérico comprende al menos una secuencia CDR escogida del grupo que consiste de las secuencias CDR3 mencionadas en este documento para los Nanocuerpos de la invención, y opcionalmente también al menos una secuencia CDR escogida del grupo que consiste de las secuencias CDR1 y secuencia CDR2 mencionada en este documento para los Nanocuerpos de la invención. Por ejemplo, tal polipéptido quimérico puede comprender una secuencia CDR escogida del grupo que consiste de las secuencias CDR3 mencionadas en este documento para los Nanocuerpos de la invención, una secuencia CDR escogida del grupo que consiste de las secuencias CDR1 mencionadas en este documento para los Nanocuerpos de la invención y una secuencia CDR escogida del grupo que consiste de las secuencias CDR1 y secuencias CDR2 mencionadas en este documento para los Nanocuerpos de la invención. Las combinaciones de CDR que se mencionan en este documento como se prefiere para los Nanocuerpos de la invención usualmente también serán preferidas para estos polipéptidos quiméricos.

En los polipéptidos quiméricos, los CDR se pueden enlazar a secuencias de aminoácido adicional y/o pueden ser

435

enlazados entre sí vía secuencias de aminoácido, en las secuencias de aminoácido son preferiblemente secuencias de estructura o son secuencias de aminoácido que actúan como secuencias de estructura, o juntos forman un andamiaje para presentar los CDR. Se hace nuevamente referencia a la técnica anterior mencionada en los últimos párrafos. De acuerdo a una modalidad preferida, las secuencias de aminoácido son secuencias de estructura humana, por ejemplo secuencias de estructura V_H3. Sin embargo, también se pueden usar secuencias de estructura, no humana, sintética, semi-sintética o no de inmunoglobulina. Preferiblemente, las secuencias de estructura usadas son de forma tal que (1) el polipéptido quimérico es capaz de enlazar xxxx, es decir con una afinidad que es al menos 1%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10%, tal como al menos 25% y hasta 50% o 90% o más de la afinidad del Nanocuerpo correspondiente de la invención; (2) el polipéptido quimérico es adecuado para uso farmacéutico; y (3) el polipéptido quimérico es preferiblemente esencialmente no inmunogénico bajo las condiciones planeadas para uso farmacéutico (es decir, indicación, forma de administración, dosis y régimen de tratamiento) del mismo (el cual puede ser esencialmente análogo a las condiciones descritas en este documento para el uso de los Nanocuerpos de la invención).

De acuerdos a una modalidad no limitante, el polipéptido quimérico comprende al menos dos secuencias CDR (como se menciona anteriormente) unidas vía al menos una secuencia de estructura, en la cual preferiblemente al menos una de las dos secuencias CDR es una secuencia CDR3, con la otra secuencia CDR siendo una secuencia CDR1 o CDR2. De conformidad a una modalidad

preferida, pero no limitante, el polipéptido quimérico comprende al menos dos secuencias CDR (como se menciona anteriormente) unido a al menos dos secuencias de estructura, en la cual preferiblemente al menos una de las tres secuencias CDR es una secuencia CDR3, con las otras dos secuencias CDR siendo secuencias CDR1 o CDR2, y preferiblemente usando una secuencia CDR1 y una secuencia CDR2. De acuerdo a una modalidad específicamente preferido, pero no limitante, los polipéptidos quiméricos tienen la estructura CR1'-CDR1-FR2'-CDR2-FR3'-CDR3-FR4', en la cual CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definen en este documento para los CDR de los Nanocuerpos de la invención, y FR1', FR2', FR3' y FR4' son secuencias de estructura. FR1', FR2', FR3' y FR4' pueden en particular ser secuencias de Estructura 1, Estructura 2, Estructura 3 y Estructura 4, respectivamente, de un anticuerpo humano (tal como secuencias V_H3) y/o partes o fragmentos de tales secuencias de Estructura. También es posible usar partes o fragmentos de un polipéptido quimérico con la estructura FR1'-CDR1-FR2-FR3'-CDR3-FR4. Preferiblemente, tal como partes o fragmentos son de forma tal que cubren el criterio mostrado en el párrafo precedente.

La invención también se refiere a proteínas u polipéptidos que comprenden y/o esencialmente consisten de polipéptidos quiméricos, a ácido nucleicos que codifican tales proteínas o polipéptidos; a métodos para preparar tales proteínas y polipéptidos; a células hospedantes que expresan o son capaces de expresar tales proteínas o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales proteínas o polipéptidos, ácidos nucleicos o células hospedantes; y al uso de tales proteínas o polipéptidos, tales ácidos

nucleicos, tales células hospedantes y/o tales composiciones, en particular para propósitos profilácticos, terapéutico y diagnóstico, tal como los propósitos profilácticos, terapéuticos o diagnóstico mencionados en este documento. Por ejemplo, tales proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, métodos, células hospedantes, composiciones y usos pueden ser análogos a las proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, métodos, células hospedantes, composiciones y usos como se describen en este documento para los Nanocuerpos de la invención.

También se notará que, cuando los Nanocuerpos de la invención contienen una o más secuencias CDR que las secuencias CDR preferidas mencionadas anteriormente, estas secuencias CDR pueden ser cualquier secuencia CDR adecuada (es decir, adecuada para por propósitos descritos en este documento) y/o estas secuencias CDR se puede obtener en cualquier manera conocida per se, por ejemplo, de Nanocuerpos (preferido), dominios V_H de anticuerpos convencionales (y en particular de anticuerpos humanos), anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos de 4 cadenas convencionales (tal como anticuerpos de 4 cadenas humanos) u otras secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra TNF. Tales secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra xxxx se pueden generar en cualquier manera conocida per se, como será claro a una persona experta en la técnica, es decir, por humanización con TNF o por selección de una biblioteca adecuada de secuencias de inmunoglobulina con TNF, o cualquier combinación adecuada del mismo. Opcionalmente, esto puede ser seguido por técnicas tales como mutagénesis dirigida al sitio o al azar y/o otras técnicas para maduración por afinidad conocidas per se. Técnicas adecuadas para generar tales secuencias de inmunoglobulina serán claras a

una persona experta, y por ejemplo incluyen técnicas de selección revisadas por Hoogenboom, Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005). Otras técnicas para generar inmunoglobulinas contra un objetivo específico, incluyen por ejemplo, la tecnología Nanoclon (como por ejemplo, se describe en la solicitud de patente provisional estadounidense no prepublicada 60/648,922), así llamada tecnología SLAM (como por ejemplo, se describe en la solicitud de patente Europea 0 542 810), el uso de ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas o las técnicas de hibridoma bien conocidas (véase por ejemplo, Larrick et al, Biotechnology, Vol. 7, 1989, p. 934). Todas estas técnicas se pueden usar para generar inmunoglobulinas contra TNF, y los CDR de tales inmunoglobulinas se pueden usar en los Nanocuerpos de la invención, es decir, como se resume anteriormente. Por ejemplo, la secuencia de tal CDR se puede determinar, sintetizado y/o aislado, e insertado en la secuencia de un Nanocuerpo de la invención (por ejemplo, para reemplazar el CDR nativo correspondiente), todas las técnicas usadas, conocidas per se como aquellas descritas en este documento, o Nanocuerpos de la invención que contienen tales CDR (o ácidos nucleicos que codifican al mismo) se pueden sintetizar de novo, nuevamente usando las técnicas mencionadas en este documento.

La invención ahora se describe por medios de los siguientes ejemplos no limitantes, en los cuales las figuras se muestra:

Nanocuerpos TNFα Monovalentes

Figura 1: Alineación de secuencia de nanocuerpos TNFα humano

Figura 2: alineación de secuencia de nanocuerpos TNFα específico de albúmina de suero

Figura 3: Enlace de nanocuerpos TNFα específico de albúmina a albúmina de suero humano

Figura 4: Enlace de nanocuerpos TNFα específico de albúmina para albúmina de suero rhesus

Figura 5: Enlace de nanocuerpos TNFα especifico de albúmina a albúmina de suero de ratón

Figura 6: Pureza de TNFα y nanocuerpos de albúmian de suero (SDS-PAGE)

Figura 7: Análisis de Manchado Western de TNFα y nanocuerpos de albúmina de suero

Figura 8: Enlace de nanocuerpos TNFα a TNFα humano (ELISA)

Figura 9: Enlace de nanocuerpos TNFα a TNFα rhesus (ELISA)

Figura 10: Ensayo del receptor-inhibición en Enberl de TNFα humano

Figura 11: Ensayo receptor-inhibición en Enbrel para TNFα rhesus

Figura 12: Enlace de nanocuerpos TNFα a TNFα humano (Biacore)

Figura 13: Enlace de nanocuerpos TNFα a TNFα rhesus (Biacore)

Figura 14: Enlace de nanocuerpos TNFα a Proteína A (Biacore)

Figura 15: Tratamiento por temperatura de TNFα y nanocuerpos de albúmina de suero (Manchado Western)

Figura 16: Estabilidad: Tratamiento por temperatura de

nanocuerpos TNFα (ELISA)

Figura 17. Tratamiento por temperatura de nanocuerpos de albúmina de suero (Biacore)

Nanocuerpos TNFα Bivalentes

Figura 18: Pureza de nanocuerpos TNFα bivalentes (SDS-PAGE)

Figura 19: Análisis de Manchado Western de nanocuerpos TNFα bivalente

Figura 20: Ensayo receptor-inhibición en Enbrel para nanocuerpos TNFα bivalentes

Figura 21: Estabilidad: Tratamiento por temperatura de nanocuerpos TNFα bivalentes (ELISA)

Nanocuerpos TNFα monovalentes humanizados

Figura 22: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados TNF1

Figura 23: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados TNF2

Figura 24: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados TNF3

Figura 25: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados ALB1

Figura 26: Pureza de TNFα humanizado y nanocuerpos de albúmina de suero (SDS-PAGE)

Figura 27: Análisis de Manchado Western de TNFα humanizado y nanocuerpos de albúmina de suero

Figura 28: Enlace de nanocuerpos TNFα humanizados a TNFα humano

441

Figura 29: Enlace de nanocuerpos de albúmina de suero humanizado a albúmina de suero humano

Figura 30: Estabilidad: Tratamiento por temperatura de nanocuerpos TNFα humanizados (ELISA)

Nanocuerpos TNFα trivalentes

Figura 31: Pureza de nanocuerpos TNFα trivalentes (SDS-PAGE)

Figura 32. Análisis de Manchado Western de nanocuerpos TNFα trivalente

Figura 33: Estabilidad: Tratamiento por temperatura de nanocuerpos TNFα trivalentes (ELISA)

Nanocuerpos TNFα monovalentes humanizados (segunda serie)

Figura 34: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados TNF1

Figura 35: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados TNF2

Figura 36: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados TNF3

Figura 37: Alineación de secuencia múltiple de nanocuerpos humanizados ALB1

Figura 38. Pureza de nanocuerpos TNFα humanizados (SDS-PAGE)

Figura 39: Análisis de Manchado Western de nanocuerpos TNFα humanizados

Figura 40: Enlace de nanocuerpos TNFα humanizados a TNFα humano

Figura 41: Estabilidad: Tratamiento por temperatura de

442

nanocuerpos TNFα humanizados (ELISA)

Figura 42: Análisis de TNF60 purificado en gel de SDS-PAGE teñido de plata (A) gel SDS-PAGE teñido de coomassie (B) y en análisis de manchado Western usando anti-NB (C) para detección

Figura 43: Cromatograma de exclusión de tamaño analítico de TNF60 en Superdex HR75

Figura 45: Curva de respuesta a la dosis obtenida en ensayo de citotoxicidad con TNF-alfa humano usando Nanobody™ TNF60 en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimumab) y Remicade (Infliximab)

Figura 46: Curva de respuesta a la dosis obtenida en ensayo de citotoxicidad con TNFα rhesus usando Nanobody™ TNF60 en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimumab) y Remicade (Infliximab)

Figura 47: Perfil de farmacocinética de TNF60 en ratones

Figura 48: Perfil de inmunogenicidad de TNF60 en ratones

Figura 49: Análisis de TNF56-PEG40 purificado, TNF56-PEG60, TNF56-biotina, TNF55-PEG40, TNF55-PEG60 y TNF55-biotina en gel de SDS-PAGE teñido de coomassie

Figura 50: Análisis de TNF56-PEG40 purificado en gel SDS-PAGE usando teñido de plata (A) teñido coomassie (B) y en análisis de manchado Western usando anti-NB (C) para detección

Figura 51: Cromatograma de exclusión por tamaño analítico de TNF56-PEG40 en Superdex HR 75

Figura 52: Cromatograma de exclusión por tamaño analítico de TNF56-PEG40 en Superdex HR 200

Figura 53: Curva de respuesta a la dosis obtenida en

ensayo de citotoxicidad con TNFα humano usando Nanobody™ TNF56-PEG40 y el Nanobody ™ de tipo nativo monovalente TNF1 en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimimab) y Remicade (Infliximab)

Figura 54: Curva de respuesta a la dosis obtenida en ensayo de citotoxicidad con TNFα Rhesus usando Nanobody™ TNF56-PEG40 en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimumab) y Remicade (Infliximab)

Figura 55: Análisis de farmacocinética de Nanobody™ TNF56-PEG40 bivalente pegilado y TNF56-PEG60 después de la administración intravenosa en ratones

Figura 56: análisis de farmacocinética de Naobody™ 3E-3E-PEG200 bivalente pegilado, Nanobody™ 3E-3E-PEG40 bivalente pegilado y Nanobody™ 3E-3E-AR1 biespecífico después de la administración intravenosa en ratones

Figura 57: Perfil de inmunogenicidad de TNF56-PEG40 y TNF56-PEG60 en ratones

Figura 58: Eficacia de TNF60 en la prevención de poliartritis crónica en ratones

Figura 59: Eficacia de TNF60 en tratamiento terapéutico de poliartritis crónica en ratones

Figura 60: Efecto de Nanobody™ TNF60 que forma una eficacia en la prevención de poliartritis crónica en ratones

Figura 61: Alineación de secuencia de Nanobodies™ PMP1C2, 3E, 1A y 3G

Figura 62: Modelo molecular de TNF-60

Las tablas añadidas forman una parte integral de la presente especificación y son como siguen:

444

Nanocuerpos TNFα monovalentes

Tabla 8: Listado de secuencia de nanocuerpos TNFα

Tabla 9: Valores Koff de nanocuerpos TNFα humanos

Tabla 10: Homología de TNFα y nanocuerpos de albúmina de suero para secuencias línea germinal humana

Tabla 11: Niveles de expresión de TNFα y nanocuerpos de albúmina de suero

Tabla 12: ELISA enlazado a TNFα humano y rhesus

Tabla 13: ensayo receptor-inhibición de nanocuerpos TNFα

Tabla 14. Análisis Biacore de nanocuerpos TNFα

Tabla 15: Enlace de nanocuerpos TNFα a TNFα (valores K_D)

Tabla 16: Potencia de nanocuerpos TNFα para neutralizar TNFα humano (a) y rhesus (b)

Tabla 17: OD280nm de TNFα y nanocuerpos de albúmina de suero después del tratamiento por temperatura

Tabla 18: Potencia de nanocuerpos TNFα después del tratamiento por temperatura

Nanocuerpos TNFα Bivalentes

Tabla 19: Listado de secuencia de nanocuerpos TNFα bivalentes y secuencia enlazadoras

Tabla 20: Constructos de nanocuerpo TNFα bivalentes

Tabla 21: Niveles de expresión de nanocuerpos TNFα bivalente

Tabla 22: Ensayo receptor-inhibición de nanocuerpos TNFα bivalente

Tabla 23: Potencia de nanocuerpos TNFα para neutralizar TNFα humano (a) y rhesus (b)

Tabla 24: OD280nm de nanocuerpos TNFα bivalentes

Nanocuerpos TNFα monovalentes humanizados

Tabla 25: Listado de secuencia de TNFα monovalente humanizado y nanocuerpos de albúmina de suero

Tabla 26: Niveles de expresión de TNFα humanizado y nanocuerpos de albúmina de suero

Tabla 27: Potencia de nanocuerpos TNFα para neutralizar TNFα humano

Tabla 28: OD280nm de TNFα humanizado y nanocuerpos de albúmina de suero

Nanocuerpos TNFα Trivalentes

Tabla 29: Listado de secuencia de nanocuerpos TNFα trivalente

Tabla 30: Constructos de nanocuerpo TNFα trivalente

Tabla 31: Niveles de expresión de nanocuerpos TNFα trivalentes

Tabla 32: Niveles de potencia de nanocuerpos TNFα para neutralizar TNFα humano

Tabla 33: Enlace de nanocuerpos trivalentes a albúmina de suero (valores K_D)

Tabla 34: OD280nm de nanocuerpos TNFα trivalentes

Nanocuerpos TNFα monovalentes humanizados (segunda serie)

Tabla 35: Listado de secuencia de nanocuerpos TNFα monovalentes humanizados de segunda serie

Tabla 36: Niveles de expresión de nanocuerpos TNFα humanizados

Tabla 37: Potencia de nanocuerpos TNFα para neutralizar TNFα humano

Tabla 38: OD280nm de nanocuerpos TNFα humanizados

Tabla 39: Comparación de bioactividad de nanocuerpos

Tablas Adicionales

Tabla 40: Observación de oligonucleótidos usados en la formación de Nanobodies ™ trivalentes

Tabla 41: Observación de oligonucleótidos usados en la clonación de Nanobodies ™ trivalentes

Tabla 42: Valores EC50 obtenidos en ensayos de citotoxicidad usando Nanobody ™ TNF60 trivalente en comparación con controles comerciales (Enbrel, Remicade, Humira)

Tabla 43: Determinación de afinidad de TNF60 y TNF24 en albúmina de suero humano en Biacore.

Nd, no determinado.

Tabla 44: Observación de oligonucleótidos usados en la formación de Nanobodies ™ bivalentes

Tabla 45: Valores EC50 obtenidos en ensayos de citotoxicidad usando Nanobodies ™ bivalentes en comparación con controles comerciales (Enbrel, Remicade, Humira)

Tabla 46: Resultados de estudios de fibroblasto derivados del sinovio

Tabla 47: Resultados de estudios bolsas de aire de murina

EJEMPLOS

447

Ejemplo 1. Identificación de nanocuerpos específicos de TNFα y albúmina de suero

Se identifican nanocuerpos antagonísticos usando llamas (*Llama glama*) inmunizado con TNFα humano por 6 inyecciones de 100 µg de la cotocina en intervalos semanales. Se realiza la selección usando ensayo en base a competencia, en el cual nanocuerpos individuales se analizan por su capacidad para inhibir en enlace de TNFα etiquetado a su receptor. Los nanocuerpos específicos de albúmina se identifican de una llama inmunizada con albúmina de suero humano. La selección de nanocuerpos individuales se realiza por ELISA usando albúmina de humano, rhesus y ratón, proporcionando un panel de nanocuerpos de reacción cruzada con la albúmina de suero de varias especies.

Ejemplo 2: Análisis de secuencia de nanocuerpos aislados

Diferentes clases de nanocuerpos se identifican en el análisis de secuencia (Figura 1) usando una matriz de registro BLOSUM62 y un valor de similitud significante de corte de ≥ 60%, Clase I (PMP1 C2, PMP1 G11, PMP1 H6), Clase II (PMP1 G5, PMP1 H2, PMP3 G2), Clase IIb (PMP1 D2), Clase III (PMP3 D10, PMP5 F10). La Tabla 8 lista las secuencias de estos anticuerpos TNFα (SEC ID Nos: 52 a 60).

En base al análisis de secuencia (Figura 2) se identifican clases diferentes de nanocuerpos de albúmina de suero usando la matriz de registro BLOSUM62 y un valor de similitud significante de corte ≥ 60%. La tabla 8 lista las secuencias de estos nanocuerpos de albúmina de suero (SEC ID Nos: 61 a 67).

448

Ejemplo 3: Análisis Biacore

TNFα

Se caracteriza el enlace de nanocuerpos a TNFα por resonancia de plasmón de superficie en un instrumento Biacore 3000. El TNF de diferentes especies es covalentemente enlazado a la superficie del chip sensor CM5 vía amina acoplada hasta que se alcanzó un incremento de 250 unidades de respuesta. Se inactivaron grupos reactivos restantes. Se valcraron enlaces de nanocuerpo a una concentración (1 en 1,000 diluido). Cada nanocuerpo se inyecta por 4 minutos a una velocidad de flujo de 45 µl/min para permitir el enlace del antígeno enlazado al chip. Amortiguador de enlace sin nanocuerpo se envía al chip en la misma velocidad de flujo para permitir la disociación espontánea del nanocuerpo enlazado por 4 horas. Se calculan valores Koff de los gramos de sensor obtenidos para los nanocuerpos diferentes.

Se analizan de cada una clase de proteínas impurificadas de nanocuerpos en Biacore. Los datos Koff se listan en la Tabla 9.

Los nanocuerpos representativos de cada clase se retienen para análisis adicional en base al valor Koff. Se selecciona para la clase I PMP1C2 (TNF1), se selecciona PMP1G5 (TNF2) como representativo de la Clase II; PMP5F10 (TNF3) se selecciona como representativo de la Clase III.

Albúmina de suero

Se sometió a ensayo el enlace como se describe anteriormente excepto que se usaron 1 en 20 diluciones. Las figuras 3, 4 y 5 ilustraciones seleccionadas de nanocuerpos TNFα

específicos de albúmina contra albúmina de suero humano, rhesus y ratón usando proteína impurificada.

Los nanocuerpos se marcan de conformidad con valores Koff, véase Tabla III abajo:

Tabla III

Clase	Humano	Rhesus	Ratón
C	PMP6A8	PMP6A8	PMP6B4
C	PMP6B4	PMP6B4	PMP6A8
B	PMP6A6	PMP6A6	PMP6A6
B	PMP6C1	PMP6C1	PMP6C1
A	PMP6G8	PMP6G8	PMP6G8
A	PMP6A5	PMP6A5	PMP6A5
D	PMP6G7	PMP6G7	PMP6G7

El mejor Koff se obtiene para elementos de la familia C y familia B. La reactividad cruzada entre albúmina de suero de ratón, humano y rhesus también se observó para elementos de aquellas familias. Un nanocuerpo representativo de clase B y C se define por análisis adicional: PMP6A6 (ALB1) se selecciona como representativo de Clase B y PMP6A8 (ALB2) se selecciona como representativo de Clase C.

Ejemplo 4: Clonación de nanocuerpos monovalentes en pAX051

Descripción de vector de expresión *Escherichia coli*

pAX051 es un derivado de pUC19. Contienen el promotor LacZ el cual es capaz de controlar la inducción de expresión usando IPTG. El vector tiene un gen de resistencia por Ampicilina o Carbenicilina. Los sitios de clonación múltiple albergan varios sitios de restricción del cual *Sfi*I y *BstE*II son frecuentemente usados para clonación de Nanobodiest™. En estructura con la secuencia que codifica NB de los códigos del vector para una

etiqueta c-myc C-terminal y una etiqueta (His)6. El péptido de señal es la secuencia líder gen3 la cual transloca el Nanobody™ expresado al periplasma.

La codificación de ADN para los nanocuerpos seleccionados TNF1 (PMP1C2), TNF2 (PMP1G2), TNF3 (PMP5F10), ALB1 (PMP6A6) y ALB2 (PMP68A), se clonaron en pAX051 y el constructo se transformó a células electropotentes TG1. Los clones fueron analizados por inserto de RCP y la secuencia de nucleótido se determinó de 4 clones positivos. Se prepararon soluciones base de glicerol a partir de clones que contienen la secuencia correcta y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 5: Expresión de nanocuerpos monovalentes

Se inició un precultivo inoculando una colonia única del clon que expresa los nanocuerpos respectivos a 37°C en caldo Luria, ampicilina/carbenicilina (100 µg/ml) y glucosa al 2% durante la noche. Este precultivo se usó para inocular. El inóculo es 1% por ciento (p/p) del cultivo de producción (medio TB + ampicilina/carbenicilina + Glucosa al 0.1%). El cultivo de producción se hace crecer a 37°C hasta que se alcanza un OD600 nm de 5-10, y la expresión del nanocuerpo es inducida agregando IPTG (concentración final de 1 mM). La expresión de proteína se permite continuar ya sea por 4 horas a 37°C o durante la noche a 28°C, en tal punto, las células son colectadas por centrifugación y almacenadas como pasta celular húmeda a -20°C.

Los extractos periplásmicos preparativos de la pasta celular húmeda almacenados a -20°C, se hacen resuspendiendo la pelotilla en amortiguador Peri (50 mM de NaH_2PO_4, 300 mM de NaCl, ajustado a pH 8.0), rotando la mezcla por 30 minutos a 4°C y

centrifugando la mezcla usando centrífuga preparativa (Sorvall RC-3C Plus con un rotor de H-6000A), para formar en pelotilla las células. El sobrenadante que representa un extracto robusto del espacio periplásmico, se colecta para purificación adicional.

Los nanocuerpos etiquetados con His(6), son purificados en Cromatografía de Afinidad Metálica Inmovilizada (IMAC). La resina TALO (Clontech), es procesada de conformidad con las instrucciones del fabricante. Los extractos son incubados con la resina por 30 minutos a TA en un rotator. La resina es lavada con PBS y transferida a una columna. La resina envasada es lavada con 15 mM de imidazol. Los nanocuerpos son eluidos de la columna usando 150 mM de imidazol. Las fracciones eluidas son analizadas por manchado en una membrana Hybond y visualización con Ponceau. Las fracciones que contienen la proteína, son combinadas y dializadas contra PBS. Las proteínas dializadas con colectadas, esterilizadas en filtro, determinadas de concentración y analizadas en alícuotas a -20°C.

Caracterización de nanocuerpos TNFα monovalentes

Ejemplo 6: Homología de secuencias de línea germinal humana

Las secuencias de aminoácido de nanocuerpos, fueron comparadas con las secuencias de línea germinal humana, como se representa en la Tabla 10. En orden de homología a las secuencias humanas, los nanocuerpos se clasifican como sigue: TNF1>TNF2>TNF3 para los nanocuerpos TNα; ALB1>ALB2 para los nanocuerpos de albúmina de suero.

Ejemplo 7: Nivel de expresión

Se calcularon los niveles de expresión y se representan en la Tabla 11. Para proporcionar la clasificación de nanocuerpos como sigue: TNF1>TNF2>TNF3 para los nanocuerpos TNFα; ALB1>ALB2 para los nanocuerpos de albúmina de suero.

Ejemplo 8: Análisis SDS-Page

Para determinar la pureza, las muestras de proteína fueron analizadas en gel de SDS-PAGE al 15%. Se agregó amortiguador de muestra Laemmli 10 µl a 10 µl (1 µg) de proteína purificada, la muestra se calentó por 10 minutos a 95°C, se enfrió y cargó en gel de SDS-PAGE al 15%. El gel se procesó de conformidad con los procedimientos generales y se tiñó con Azul Brillante de Coomasie (CBB). La Figura 6 representa el SDS-PAGE para los nanocuerpos específicos de albúmina de suero y específicos de TNF-α.

Ejemplo 9: Análisis de manchado Western

Se cargaron 100 ng de proteína purificada en el gel. Después del SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando la Célula de Transferencia Electroforética Mini Trans-Blot® (Biorad). La membrana se bloqueó durante la noche en PBS, caseína al 1% a 4°C. Como todos los constructos se fusionaron a etiqueta c-myc, se usó el anticuerpo anti-myc monoclonal de ratón como una herramienta de detección. Además, se usó el anti-Nanocuerpo policlonal de conejo (R23) como una herramienta de detección. El manchado se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación en anticuerpo anti-myc diluido 1/2000 en PBS ó anticuerpo anti-Nanocuerpo 1/200 en PBS, 1% de caseína. La membrana se lavó 5 veces en PBS antes de que se

aplicara el anticuerpo secundario (conjugado de fosfatasa alcalina IgG de conejo-anti-ratón, Sigma, A1902, diluida 1/1000 en PBS o conjugado de fosfatasa alcalina IgG anti-conejo de cabra, Sigma, A8025, 1% de caseína). Después de la incubación con agitación suave por 1 hora a temperatura ambiente, la membrana se lavó 5 veces en PBS. Los manchados fueron revelados usando soluciones de BCIP/NBT y la reacción se detuvo lavando el manchado con agua milliQ cuando las bandas fueron claramente visibles. La Figura 7 representa el análisis de manchado Western.

Ejemplo 10: Enlace ELISA a TNFα Rhesus y humano

Se realizó un ELISA para examinar el enlace a TNFα humano y Rhesus. Se revistió una placa Maxisorp de 96 cavidades con 2 µg/ml de Neutravidina en PBS ON a 4°C. Las placas fueron bloqueadas con 1% de caseína por 2 horas a TA. El TNFα biotinilado (400 ng/ml), se agregó a las cavidades y se incubó por 1 hora a TA. Las muestras de nanocuerpos fueron diluidas partiendo a 2 µg/ml y usando diluciones 1 a 3. Los nanocuerpos fueron detectados usando fosfatasa alcalina anti-myc de ratón (1/2000 diluida) y anti-ratón (1/200 diluida, Sigma A1902) y pNPP (2mg/ml) como un sustrato. Las Figuras 9 y 10 representan el enlace en ELISA un TNFα Rhesus y humano.

Los resultados son resumidos en la Tabla 12. El TNF1 y TNF3, mostró enlace a TNFα tanto humano como Rhesus. El TNF2 es enlazado a TNFα humano, pero solamente es débilmente reactivo a TNFα Rhesus.

Ejemplo 11: Ensayo de inhibición del receptor

La capacidad para inhibir la interacción del ligando-

receptor, se analizó para TNFα humano y Rhesus. Se revistió una placa Maxisorp de 96 cavidades con 2 µg/ml de Enbrel en PBS ON a 4°C. Las placas fueron bloqueadas con 1% de caseína por 2 horas a TA. Las muestras de nanocuerpos fueron pre-incubadas por 30 minutos a TA con TNFα biotinilado (10 ng/ml) partiendo a una concentración de 5 µg/ml y usando diluciones 1 en 2. Las muestras fueron agregadas a las placas e incubadas por 1 hora a TA. El TNFα biotinilado se detectó usando fosfatasa alcalina de Estravidina (1/2000 diluida) y pNPP (2 mg/ml) como sustrato. Las Figuras 11 y 12, representan una inhibición de ELISA para TNFα humano y Rhesus. Los resultados se resumen en la Tabla 13. La inhibición del enlace de ligando/receptor, se observa para TNF1 y TNF3, para TNF tano humano como Rhesus, mientras el TNF2 es solamente inhibición de TNFα humano.

Ejemplo 12: Análisis Biacore

Enlace TNFα

Se realizó el análisis como se describe en el Ejemplo 3. Las Figuras 13 y 14 ilustran el enlace a TNFα Rhesus y humano vía análisis Biacore. Los resultados se resumen en la Tabla 14. Los experimentos de enlace en Biacore, confirman los resultados de ELISA: enlace reactivo cruzado para TNF1 y TNF3, mientras el TNF2 solamente se enlaza significantemente a TNFα humano.

Albúmina de suero

El enlace se ensayó como se describe anteriormente, excepto que se usó la serie de diferentes concentraciones. Cada concentración se inyectó por 4 minutos a una velocidad de flujo de 45 µl/min para permitir el enlace al antígeno unido al chip.

El amortiguador de enlace sin analito, se asentó sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación de nanocuerpo unido. Después de 15 minutos, el analito unido restante, se removió por inyección de la solución de regeneración (25 mM de NaOH).

A partir de los sensogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de cada analito, se calcularon los valores KD vía afinidad de estado listo cuando se alcanzó el equilibrio.

Los resultados son resumidos en la Tabla 15. Se observó una reactividad cruzada para tanto ALB1 como ALB2. La afinidad más alta se observó para ALB2 en TNFα humano y Rhesus. Sin embargo, la diferencia en afinidad para albúmina de suero humano de ratón contra humano/Rhesus, es más pronunciada para ALB2 (factor 4000), mientras para ALB1, se observa una diferencia de un factor 12.

Ejemplo 13: Bio-ensayo

Se usó la línea de células de fibroblasto de ratón L929 sensibles a TNFα, para medir la reactividad anti-TNFα de los nanocuerpos seleccionados. A una concentración suficientemente alta de TNFα en el medio, es decir, la dosis citotóxica, las células L929 se sometieron a necrosis. La inhibición de interacción de TNF con su receptor, se determina preincubando una serie de diluciones de anticuerpo con una concentración citotóxica de TNFα antes de agregar la mezcla a las células. La presencia de actinomicina D en el medio, sensibiliza las células además, al TNFα, resultando en una sensibilidad incrementada del bioensayo para TNFα libre.

Las células L929 se hicieron crecer a cercana confluencia, se plaquearon en placas microtituladoras de 96 cavidades a 5000 células por cavidad y se incubaron durante la noche. La actinomicina D se agregó a las células a una concentración final de 1 µg/ml. Las diluciones seriales de los nanocuerpos a ser probados, se mezclaron con una concentración citotóxica de TNFα (concentración de ensayo final es 0.5 ng/ml o 15 IU/ml). Después de al menos, 30 minutos de incubación a 37°C, esta mezcla se agrega a las células plaqueadas. Las placas son incubadas por 24 horas a 37°C y CO_2 al 5%. La viabilidad celular se determina por el uso de la sal de tetrazolio WST-1. Las curvas de respuesta de dosis y los valores EC50, son calculados con el Prima Graphpad.

Los resultados son resumidos en la Tabla 16 para TNFα humano y Rhesus. Basados en su potencia para neutralizar la actividad citotóxica, las moléculas son clasificadas como sigue: TNF3>TNF1>TNF2 para TNFα humano y TNF1= TNF3>TNF2 para TNFα Rhesus.

Ejemplo 14: Enlace de Proteína A

La Figura 14 representa el enlace de Proteína A analizado en Biacore como se describe en el Ejemplo 12. Se obtuvo el enlace positivo para TNF1, TNF2, ALB1. No se observó ningún enlace o enlace débil para TNF3 y ALB2.

Ejemplo 15: Estabilidad de temperatura

Las muestras fueron diluidas a 200 µg/ml y divididas en 8 alícuotas que contienen 500 µl. Los viales diferentes fueron incubados cada uno a una temperatura dada variando desde TA hasta

90°C. Después del tratamiento, las muestras fueron enfriadas por 2 horas a TA, se mantuvieron a 4°C. Se removieron los precipitados por centrifugación por 30 minutos a 14,000 rpm. El SN fue cuidadosamente removido y analizado adicionalmente.

OD280nm

El OD a 280 nm, se midió y la concentración se calculó. Los resultados se resumen en la Tabla 17. Se observó un decremento en el contenido de proteína para TNF2 y TNF3 partiendo a 80°C, mientras que para ALB2, se observó un decremento partiendo de 70°C.

Manchado Western

2 µg de proteína tratada, se separaron en SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se trataron como se describe anteriormente. La detección se realizó usando anti-Nanocuerpo policlonal (R23, 1/2000 diluido), y peroxidasa picante de caballo anti-conejo (DAKO, P0448, 1/2000 diluida). La figura 15 representa el análisis de Manchado Western. Se observó una gota transparente en la concentración de proteína para ALB2 tratados a 70, 80 y 90°C. La agregación todavía se observó para TNF1 tratado a 70, 80, y 90°C; para TNF3 tratado a 90°C; para ALB1 tratado a 90°C, significa que todavía contiene rastros de precipitados, los cuales resultan en una lectura OD280nm superior. Esto explica porqué la concentración de la proteína medida a OD280 nm, no se reduce para TNF1, TNF3 y ALB1 tratados estas T superiores.

ELISA

El ELISA para detectar enlace a TNFα humano, fue esencialmente realizado como se describe en el Ejemplo 10. Los resultados se presentan en la Figura 16. El enlace de TNFα humano, fue reducido para TNF1, TNF26 y TNF3 partiendo a 80°C.

Bio-Ensayo

El bio-ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados son resumidos en la Tabla 18. La potencia de los nanocuerpos se reduce para TNF1 partiendo a 70°C; para TNF2 y TNF3 partiendo a 80°C.

Biacore

El enlace a albúmina de suero humano se determinó como se describe en el Ejemplo 12. Se usó una concentración fija (1 en 50 diluida). Los resultados se presentan en la Figura 17. El tratamiento de temperatura no está influenciando el enlace a albúmina de suero para ALB1. El tratamiento tiene un efecto en el Kon para ALB2 partiendo de T-70°C.

Nanocuerpos Bivalentes

Ejemplo 16: Formateado de nanocuerpos específicos de TNFα bivalentes

Se formatearon TNF1, TNF2 y TNF3 a nanocuerpos bivalentes. Se usó un espaciador entre los dos bloques de construcción ya sea un enlazador GlySer 9AA (Tabla 19 SEC ID NO:68), o un enlazador GlySer 30 AA (Tabla 19 SEC ID NO:69). Esto generó constructos representados por la Tabla 20. La Tabla 19 lista las secuencias de estos nanocuerpos TNFα bivalentes (SEC ID NOs: 70 a 75).

Ejemplo 17: Expresión de nanocuerpos específicos de TNFα bivalentes

Se realizó la expresión como se describe en el Ejemplo 5. Los nanocuerpos etiquetados con His(6), fueron purificados en Cromatografía de Afinidad Metálica Inmovilizada (IMAC). La resina Ni-NTA (Qiagen), fue procesada de conformidad con las instrucciones del fabricante. Los extractos fueron incubados con la resina e incubados por 30 minutos a TA en un rotator. La resina se lavó con PBS y se transfirió a una columna. La resina envasada se lavó con PBS (1 en 10 diluida). La columna fue pre-eluida con 15 mM de Imidazol. Los nanocuerpos fueron eluidos de la columna usando 25 mM de ácido cítrico a pH 4. Las fracciones eluadas fueron analizadas por manchado en la membrana Hybond y por visualización con Ponceau. Las fracciones que contienen la proteína, fueron combinadas y además purificadas en un intercambio catiónico, seguido por exclusión de tamaño. Las proteínas purificadas fueron colectadas, esterilizadas en filtro, determinadas de concentración y almacenadas en alícuotas a -20°C.

Caracterización de nanocuerpos específicos de TNFα bivalentes

Ejemplo 18: Nivel de expresión

Se calcularon los niveles de expresión de los nanocuerpos TNFα bivalentes y se representan en la Tabla 21. El enlazador no tiene efecto significante en el nivel de expresión de los nanocuerpos.

Ejemplo 19: SDS-PAGE

Se realizó SDS-Page como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 18 muestra el resultado del SDS-Page.

Ejemplo 20: Manchado Western

Se realizó análisis de Manchado Western como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 19 representa los resultados del Manchado Western.

Ejemplo 21: Ensayo de Inhibición del receptor

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 11. La Figura 20 y la Tabla 22, representan los resultados. El mejoramiento de la inhibición del enlace ligando/receptor, se observó para todos los nanocuerpos bivalentes, comparados con el formato monovalente.

Ejemplo 22: Bio-ensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados son resumidos en la Tabla 23. Basados en su potencia para neutralizar la actividad citotóxica, el TNF8, TNF7, TNF9 y TNF5, tienen una potencia en el intervalo de Enbrel.

Ejemplo 23: Estabilidad de temperatura

Se analizaron muestras como se describe en el Ejemplo 15.

OD280 nm

El OD a 280 nm, se midió y la concentración se calculó. Los resultados se resumen en la Tabla 24. Se observó un decremento en el contenido de proteína para TNF4 y TNF7 partiendo a 70°C, mientras que para TNF5, TNF6, TNF8 y TNF9, se observó un

decremento partiendo de 80°C.

Manchado Western

Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados como se describe en el Ejemplo 15.

ELISA

El ELISA para detectar enlace a TNFα humano, fue esencialmente realizado como se describe anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 21. El enlace de TNFα humano, fue reducido para TNF5, TNF6, TNF8 y TNF9 partiendo a 80°C, para TNF4 y TNF7 partiendo de 70°C.

Nanocuerpos monovalentes humanizados

Ejemplo 24: Identificación de posiciones de aminoácido no humanos en TNFα y nanocuerpos específicos de albúmina de suero

La Figura 22 (TNF1), Figura 23 (TNF2), Figura 24 (TNF3) y Figura 25 (ALB1), representan alineaciones de secuencias múltiples (Clustal W 1.7), con secuencias DP51, DP53, DP54 y DP29.

Además de las mutaciones de aminoácido, la optimización de codón se realizó proporcionando las secuencias de la Tabla 25 SEC ID NOS: 76 a 89 (Nanocuerpos contra TNF-alfa y albúmina de suero humano, respectivamente).

Ejemplo 25: Generación de mutantes de codón optimizado

Los oligonucleótidos fueron sintetizando abarcando la secuencia completa de los nanocuerpos.

Ejemplo 26: Expresión de nanocuerpos específicos de TNFα bivalentes

Se realizó la expresión como se describe en el Ejemplo 5.

Caracterización de nanocuerpos humanizados

Ejemplo 27: Nivel de expresión

La Tabla 26 representa los niveles de expresión calculados. La expresión se logró con rendimientos en el intervalo de 3.5-11.7 mg/ml. El tiempo de inducción no influencia el rendimiento.

Ejemplo 28: SDS-PAGE

Se realizó SDS-Page como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 26 muestra el gel de SDS-Page.

Ejemplo 29: Manchado Western

Se realizó análisis de Manchado Western como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 27 representa los resultados del Manchado Western.

Ejemplo 30: Bio-ensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13.

Los resultados de los nanocuerpos humanizados son resumidos en la Tabla 27. Los nanocuerpos de tipo nativo son incluidos como referencia.

Ejemplo 31: Biacore

El análisis se realizó como se describe en el Ejemplo

12. La Figura 28 y 31, muestran los resultados de Biacore.

Ejemplo 32: Estabilidad de temperatura

Se analizaron muestras como se describe en el Ejemplo 15.

OD280 nm

El OD a 280 nm, se midió y la concentración se calculó. Los resultados se resumen en la Tabla 28.

No se observó un decremento significante en la concentración de proteína para los nanocuerpos humanizados TNF1 (TNF13-14). Se observó un decremento en la concentración de proteína para TNF2 humanizado (TNF15-19) y TNF3 (TNF20-23), partiendo a 80°C. Se observó un decremento en la concentración de proteína para ALB1 humanizado (ALB4-5), partiendo a 70°C y para ALB3 partiendo a 60°C.

Manchado Western

Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados como se describe en el Ejemplo 15.

ELISA

El ELISA para detectar enlace a TNFα humano, fue esencialmente realizado como se describe en el Ejemplo 15. Los resultados se presentan en la Figura 30.

El enlace a TNFα humano es comparable para TNF1 WT tratado con temperatura y el TNF13 y 14 humanizado; para TNF2 WT tratado con temperatura y el TNF15-19 humanizado: el enlace a TNFα humano, es reducido por TNF21 y 22, y a una extensión menor

para TNF23, mientras no se observa efecto para TNF20, comparado con el TNF3 WT tratado con temperatura.

Nanocuerpos trivalentes TNFα

Ejemplo 33: Formación de nanocuerpos específicos de TNFα trivalentes

Se formatearon TNF1, TNF2, TFN3, y ALB1 a nanocuerpos trivalentes. Como espaciador entre los 2 bloques de construcción, se usó ya sea un enlazador GlySer 9AA (Tabla 19 SEC ID NO:68), o un enlazador GlySer 30 AA (Tabla 19 SEC ID NO:69). Esto genera los constructos de la Tabla 30. La Tabla 29 lista las secuencias de nanocuerpos TNFα trivalentes (SEC ID NOS: 91 a 94).

Ejemplo 34: Expresión de nanocuerpos específicos de TNFα trivalentes

Se realizó la expresión como se describe en el Ejemplo 5. Los nanocuerpos etiquetados His(6), son purificados en una Cromatografía de Afinidad Metálica Inmovilizada (IMAC). La resina Ni-NTA (Qiagen), es procesada de conformidad con las instrucciones del fabricante. Los extractos son incubados con la resina e incubados por 30 minutos a TA en un rotator. La resina es lavada con PBS y transferida a una columna. La resina envasada es lavada con PBS (1 en 10 diluida). Se pre-eluye con 15 mM de imidazol. Los nanocuerpos son eluidos de la columna usando 25 mM de ácido cítrico a pH =4. Las fracciones eluadas son analizadas marcando en una membrana Hybond y visualizando con Ponceau. Las fracciones que contienen la proteína son combinadas y además purificadas en intercambio catiónico, seguido por exclusión de tamaño. Las proteínas purificadas son colectadas, esterilizadas

con filtro, determinada la concentración y almacenadas en alícuotas a -20°C.

Caracterización de nanocuerpos específicos de TNFα/SA trivalentes

Ejemplo 35: Nivel de expresión

Los niveles de expresión fueron calculados y representados en la Tabla 31.

Ejemplo 36: Análisis de SDS-PAGE

Se realizó SDS-Page como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 31 muestra el gel de SDS-Page.

Ejemplo 37: Análisis de Manchado Western

Se realizó análisis de Manchado Western como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 32 representa el análisis de Manchado Western.

Ejemplo 38: Bio-ensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13.

Los resultados de los nanocuerpos bivalentes, son resumidos en la Tabla 32. Basados en su potencia para neutralizar la actividad citotóxica, las moléculas son igualmente potentes comparables con su potencia como moléculas bivalentes.

Ejemplo 39: Enlace a Albúmina de Suero Humano

El enlace se ensayó como se describe anteriormente, excepto que se usaron series de concentraciones diferentes. Cada concentración se inyectó por 4 minutos a una velocidad de flujo

de 45 µ/min, para permitir el enlace al antígeno unido al chip. Después, el amortiguador de enlace sin analito, se asentó sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación de nanocuerpo unido. Después de 15 minutos, el analito unido restante, se removió por inyección de la solución de regeneración (25 mM de NaOH).

A partir de los sensogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de cada analito, se calcularon los valores KD vía afinidad de estado listo cuando se alcanzó el equilibrio.

Los resultados son resumidos en la Tabla 33. Se observó una reducción en la afinidad para el enlazador ALB1 formateado, comparado con el ALB1 de tipo nativo. La afinidad sin embargo, todavía está en el intervalo de 7.2-14 nM.

Ejemplo 40: Estabilidad de temperatura

Se analizaron muestras como se describe en el Ejemplo 15.

OD280 nm

El OD a 280 nm, se midió y la concentración se calculó. Los resultados se resumen en la Tabla 34. Se observó un decremento en el contenido de proteína para TNF4, TNF27 y TNF28 partiendo a 60°C, mientras que para TNF25 y TNF26, partiendo de 70°C.

Manchado Western

Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados como se describe en el Ejemplo 15.

ELISA

El ELISA para detectar enlace a TNFα humano, fue esencialmente realizado como se describe anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 33. El enlace de TNFα humano, fue reducido para TNF4 y TNF27 partiendo de 60°C, y para TNF25, TNF26 y TNF28 partiendo a 70°C.

Nanocuerpos monovalentes humanizados (segunda ronda)

Ejemplo 41: Identificación de posiciones de aminoácido no humano en TNFα y nanocuerpos específicos de albúmina de suero

La Figura 34 (TNF1), Figura 35 (TNF2), Figura 36 (TNF3) y Figura 37 (ALB1), representan alineaciones de secuencias múltiples (Clustal W 1.7), con secuencias DP51, DP53, DP54 y DP29. Las moléculas mutadas fueron expresadas y purificadas como se describe anteriormente, proporcionando las secuencias de la Tabla 35, SEC ID NOs: 95 a 104 (contra TNF-alfa y albúmina de suero humano, respectivamente).

Caracterización de nanocuerpos humanizados

Ejemplo 42: Nivel de Expresión

La tabla 36 representa los niveles de expresión calculados. La expresión se logó con rendimientos en el intervalo de 0.5-2.7 mg/ml.

Ejemplo 43: SDS-PAGE

Se realizó SDS-Page como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 38 muestra el gel de SDS-Page.

Ejemplo 44: Manchado Western

Se realizó análisis de Manchado Western como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 39 representa los resultados del Manchado Western.

Ejemplo 45: Bio-ensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13.

Los resultados de los nanocuerpos humanizados son resumidos en la Tabla 37. Los nanocuerpos de tipo nativo y la primera ronda de nanocuerpos humanizados, son incluidos como referencia.

Ejemplo 46: Biacore

El análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 12. La Figura 40, muestra los resultados de Biacore.

Ejemplo 47: Estabilidad de temperatura

Se analizaron muestras como se describe en el Ejemplo 15.

OD280 nm

El OD a 280 nm, se midió y la concentración se calculó. Los resultados se resumen en la Tabla 38.

No se observó un decremento significante en la concentración de proteína para los nanocuerpos humanizados TNF1 (TNF29-30). Se observó un decremento en la concentración de proteína para TNF2 humanizado (TNF31-32) y TNF3 (TNF33), partiendo a 80°C.

Manchado Western

Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados como se describe en el Ejemplo 15.

ELISA

El ELISA para detectar enlace a TNFα humano, fue esencialmente realizado como se describe en el Ejemplo 15. Los resultados se presentan en la Figura 41.

El enlace a TNFα humano es comparable para TNF1 WT y el TNF29 y TNF30 humanizado; comparable para TNF2 WT y el TNF31 y TNF32; y también para TNF3 WT y TNF33 humanizado.

Ejemplo Comparativo

En este Ejemplo Comparativo, se compararon nueve Nanocuerpos de la invención con tres Nanocuerpos del documento WO 04/041862, llamados "V_{HH}#1A" ó "1a", "V_{HH}3E" ó "3E" y "V_{HH}#3G" o "3G", respectivamente (SEC ID NOS: 1, 4 y 5 en el documento WO 04/041862). El ensayo usado como el ensayo a base de célula usando células KYM es referido en el documento WO 04/41862 (véase por ejemplo, el Ejemplo 1 bajo 3)). Los resultados son mencionados en la Tabla 39 siguiente. Como se puede ver, los Nanocuerpos de la invención tienen un valor EC50 en este ensayo, que es 18 veces mejor que el valor EC50 de 3E, el mejor desempeño de Nanocuerpo de conformidad con el documento WO 04/041862.

Ejemplo 48: Generación de Nanobodies™ (Nanocuerpos) humanizados biespecíficos trivalentes

Los Nanocuerpos biespecíficos trivalentes, se

formatearon y clonaron en el vector de expresión de E. coli pAX054 primero, y después se rescataron a través de RCP y se clonaron en el vector de expresión pPICZαA.

Descripción del vector de expresión de Escherichia coli

El pAX54, es un derivado de pUC19. Contiene el promotor LacZ el cual permite una inducción controlada de expresión usando IPTG. El vector tiene un gen de resistencia para Ampicilina o Carbenicilina. Los sitios de clonación múltiple, albergan varios sitios de restricción de los cuales, *Sfi*I y *BstE*II, son frecuentemente usados para clonación de los Nanobodies™. La señal peptídica es la secuencia líder gen3, la cual transloca el Nanobody™ expresado en el periplasma.

Descripción del vector de expresión de Pichia pastoris

El pPICZαA contiene un origen derivado de pUC de replicación, permitiendo la propagación en *E. coli*. Contiene el promotor del gen AOX1 de Pichia pastoris (oxidasa de alcohol 1). Esta región promotora de 942 bp (i) permite la expresión de alto nivel, inducible por metanol del gen de interés, y (ii) dirige la integración del plásmido con el sitio *AOX1*, después de la transformación de Pichia con el ADN vector que es linearizado dentro de la región promotora de *AOX1* en 5'. Se nota que los vectores pPICZα, no contienen un origen de levadura de replicación y que, consecuentemente, los transformantes pueden solamente ser aislados si ocurre la recombinación entre el plásmido y el genoma de Pichia. El vector especifica la resistencia al antibiótico Zeocina en células hospederas tanto en *E. coli* como en *Pichia pastoris*. El vector incorpora la señal de secreción del factor de α-apareamiento de *Saccharomyces*

cerevisiae permitiendo la secreción eficiente de la mayoría de las proteínas al medio de cultivo. El ATG de en la secuencia de señal del factor-α corresponde al ATG de iniciación nativo del gen *AOX1*. El sitio de clonación múltiple alberga varios sitios de restricción de los cuales, el XhoI/EcoRI o XhoI/NotI, son típicamente usados para fusión de las secuencias de codificación de Nanobody™ con la señal de secreción. El sitio de clonación múltiple es seguido por la región de terminación de la transcripción *AOX1*. Más detalles en este vector de expresión se pueden encontrar en el sitio de red de Invitrogen. (http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)

Formateado de Nanocuerpos trivalentes

Se establecieron tres reacciones de RCP separadas, para amplificar la subunidad de Nanobody™ N-terminal, media y C-terminal, usando las combinaciones de oligo indicadas en el WPA-0012. El Nanobody™ N-terminal se amplificó usando M13_rev/ Rev_9GlySer_L108; el Nanobody™ medio se amplificó usando For_GlySer/Short y Rev_15BspEI_L108; el Nanobody™ C-terminal se amplificó usando For_BspEI/M13_for. Una reacción de RCP de 1 µl de ADN plásmido (50-100 ng), 1.5 µl de cebador delantero (10 µM → 300 nM), 1.5 µl de cebador inverso (10 µM → 300 nM), 1 µl dNTPs (10 mM → 0.2 mM), 5 µl de amortiguador (10x → 1x), 0.75 µl de enzima (3.5 U/µl → 2.6 U/µl) y 39.25 µl de H_2O con un volumen total de 50 µl, se preparó. Las secuencias cebadoras se proporcionan en la Tabla 40. Se inició un programa de RCP con 2 minutos a 94°C. Se repitió un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C, 30 veces y se siguió por 10

472

minutos a 72°C. La amplificación se verificó separando 5 µl de la reacción de RCP en gel de agarosa al 2%. El producto de RCP se purificó usando un Kit de Purificación de RCP QIAquick, de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y se eluyó con 50 µl de amortiguador EB. El fragmento VHH N-terminal se preparó incubando 50 µl de DNA y 2 µl de BamHl (10 U/µl) en el amortiguador apropiado recomendado por el fabricante a 37°C por 2 horas. Subsecuentemente, se agregaron 2 µl de SfiI (10U/µl) y la mezcla se incubó a 55°C por 2 horas. El fragmento de VHH medio se preparó incubando 50 µl de DNA y 2 µl de BamHl (10 U/µl) y 2 µl de BspEl (10 U/µl) en el amortiguador apropiado recomendado por el fabricante a 37°C por horas. El fragmento VHH C-terminal se preparó incubando 50 µl de ADN con 2 µl de BspEI (10 U/µl) en el amortiguador apropiado recomendado por el fabricante a 37°C por 2 horas. Subsecuentemente, se agregaron 2 µl BstEII (10 U/µl) y la mezcla se incubó a 60°C por 1 hora. Las reacciones de digestión previas se separaron en gel de agarosa al 2%. Las bandas de VHH (350-450 pb), se cortaron por el gel y el ADN se purificó usando el Kit de Extracción de Gel QIAquick, de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna (con un máximo de 400 mg de gel de agarosa por columna) y el ADN unido se eluyó con 50 µl de amortiguador EB. La concentración de ADN se determinó midiendo el OD_{260} (1 unidad de OD = 50 µg/ml). Una mezcla de ligación con un volumen final de 10 µl que contiene 100 ng de vector pAX54, 12 ng de VHH N-terminal, 12 ng del fragmento VHH medio, 12 ng del fragmento VHH C-terminal, 1 µl de amortiguador de ligación y 1 µl de ligasa (3U), se preparó e incubó por 2 horas a temperatura ambiente. La transformación de *E. coli*, TG1, se realizó usando 2 µl de la

mezcla de ligación. Las colonias se analizaron usando RCP como se describe en el documento WPA-0010. El análisis de secuencia se realizó en clones positivos. La preparación del plásmido se realizó usando un Kit Miniprep de centrifugación Qiaprep (Qiagen), de conformidad con las instrucciones del fabricante y se describe anteriormente. El secuenciamiento se realizó en las instalaciones de secuencias VIB, Antwerp, Bélgica.

Amplificación de ADN de codificación

La región de codificación de Nanobody^{tm} clonada en el vector de expresión de E. coli pAX054, es rescatada a través de PCR usando un par cebador apropiado. Para asegurar que el Nanobody™ es expresado con un N-término nativo, la región de codificación es clonada en estructura con el sitio de desdoblamiento de Kex2 de la señal de secreción. El cebador delantero fusiona la parte C-terminal de la señal de secreción, hasta el sitio de reconocimiento de Xho1, con la región de codificación de Nanobody™. Se preparó una reacción de RCP de 1 µl de ADN de plásmido (50-100 ng), 1.5 µl de cebador delantero (10 µM → 300 nM), 1.5 µl de cebador inverso (10 µM → 300 nM), 1 µl de dTNPs (10 mM → 0.2 mM), 5 µl de amortiguador (10x → 1x), 0.75 µl de enzima (3.5 U/µl → 2.6 U) y 39.25 µl de H_2O con un volumen total de 50 µl. Las secuencias cebadoras se proporcionan en la Tabla 41. Se inició un programa de RCP con 2 minutos a 94°C. Un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C, se repitió 20 veces y se siguió por 10 minutos a 72°C. La amplificación se verificó por separación de 5 µl de la reacción de RCP en gel de agarosa al 2%. El producto de RCP se purificó usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick, de

conformidad con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y el ADN unido se eluyó con 50 µl de amortiguador EB.

Estrategia de clonación

El fragmento de ADN que codifica para el NB, así como también el vector de expresión de pPICZαA, es digerido con la enzima de restricción apropiada (XhoI + NotI). El inserto es obtenido incubando 50 µl del producto de PCR con 2 µl de XhoI (10 U/µl) y 2 µl de NotI (10 U/µl) en el amortiguador apropiado recomendado por el fabricante por 3 horas a 37°C. El vector es obtenido de manera similar, adaptando la cantidad de enzimas de restricción con la cantidad de plásmido. Tanto el vector como el fragmento de codificación de NB, son purificados y la concentración de ADN es cuantificada usando el BioPhotometer (Eppendorf). El fragmento y el vector aceptor son ligados en una relación equimolar usando 1 Unidad de ligasa T4 (Promega) por 30 minutos, a temperatura ambiente o durante la noche a 16°C. El ADN (20-30 ng), es transformado a células TG1. Las colonias son analizadas a través de RCP usando los cebadores 3'AOX1 R y 5'AOX1 F. El análisis de secuencia es realizado en clones positivos. Se formateó TNF30, TNF33 y ALB8 a Nanobodies™ biespecíficos trivalentes. Se usó un espaciador entre los bloques de construcción de un enlazador GlySer 9AA.

Transformación de P. pastoris

Para aislar el plásmido de ADN, se inició un precultivo inoculando una colonia única del clon en 50 ml de Caldo Luria + Ampicilina o Carbenicilina (100 µg/ml) + 2% de glucosa e incubación a 37°C durante la noche. El ADN de plásmido es

preparado usando el Kit Midi Plasmid (Qiagen), de conformidad con las instrucciones del fabricante. El ADN es linearizado incubando 30 µg de ADN de plásmido con 6 µl de BstX1 (10 U/µl) en el amortiguador apropiado, de conformidad con las instrucciones del fabricante por 3 horas a 45°C. El ADN digerido es purificado usando el kit de Purificación de PCR (Qiagen), de conformidad con las instrucciones del fabricante. El ADN es concentrado usando precipitación de EtOH de conformidad con los procedimientos estándares. Las células electrocompetentes X-33 son transformadas con 10 µg de ADN linearizado y las células se dejan crecer por 48 horas en una placa de agar YPD selectiva que contiene Zeocina (100/250/500 µg/ml). La X-33 es una cepa de *Pichia pastoris* tipo nativa; la cepa misma, así como también las cepas recombinantes derivadas, contienen el gel nativo AOX1 y son capaces de metabolizar el metanol (Mut^+).

Los clones son seleccionados por nivel de expresión inoculando las colonias únicas en 1 ml de BGCM en una placa de 24 cavidades y se hicieron crecer por 48 horas a 30°C a 12 rpm. Las células son centrifugadas y se agrega BMGM fresco a las células para crecer a 30°C a 120 rpm durante 48 horas. Después, se agrega MeOH a una concentración final de 0.5% y las células se hacen crecer a 30°C a 120 rpm durante 8 horas, después de lo cual, se agrega MeOH nuevamente a una concentración final de 0.55. Las células se hacen crecer durante la noche a 30°C a 120 rpm. Las células son centrifugadas y el sobrenadante es colectado y analizado en ELISA como se describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 49: Expresión y purificación de Nanobodies™ humanizados biespecíficos trivalentes

Producción en Pichia pastoris

La composición de amortiguadores, soluciones y otros, puede ser encontrada en el sitio de red de Invitrogen (http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf).

Se inició un precultivo inoculando una colonia única de la placa en 5 ml de YPD. El cultivo se hizo crecer durante la noche a 180 rpm y a 30°C. Al siguiente día, el pre-cultivo se diluyó a 50 ml de YPD y se hizo crecer durante la noche a 180 rpm y a 30°C. Los cultivos de producción se iniciaron inoculando el pre-cultivo a un OD600nm = 0.04-0-08 final. Los cultivos se hicieron crecer en BGCM por 24 horas a 30°C a 180 rpm y se centrifugaron a 4,500 rpm por 30 minutos. Las células se resuspendieron en 1/3 del volumen original en medio BMGM con un OD600 nm = 15-20 final. Las células se indujeron con MeOH a puntos de tiempo regulares, típicamente 3 veces/día, nunca excediendo el contenido de MeOH al 1%. Después de 50 horas de inducción, el sobrenadante es colectado.

Purificación de Nanocuerpo expresado en Pichia pastoris

El sobrenadante de cultivo se filtra sobre una membrana de micro filtración de .22 µm (Hydrosart, Sartorius). La muestra es concentrada usando diafiltración en una membrana de ultra filtración de 10 kDa (HydroSart, Sartorius) y se concentra a 0.5-1 L. Los Nanobodies™, son purificados usando cromatografía de afinidad de Proteína A (MabSelect Xtra, GE Healthcare), usando PBS como amortiguador de corrida y Glicina [100 mM pH 2.5] para elución. Las muestras son analizadas usando 1.5 M de Tris pH =

8.8. Los Nanobodies™ son además procesados en Cromatografía de Intercambio Aniónico (Source 30Q, GE Healthcare). Las muestras son diluidas 10 veces con 10 mM de Piperazina a pH 10.2 y ajustadas a pH =10.2, con 1 M de NaOH y una conductividad de <2 mS/cm con agua MiliQ.

Los nanocuerpos son procesados en cromatografía de exclusión de tamaño (Superdex 75 pg, Hiload XK26/60, GE Helathcare) y se remueve el LPS vía Cromatografía de Intercambio Aniónico (Source 30Q, GE Healthcare), por pasos a través de una columna de 5 ml, la cual es sanitizada con NaOH 1 M y equilibrada en Dulbecco PBS.

Para determinar la pureza, las muestras de proteína son analizadas en gel de SDS-PAGE al 15% como se describe en el ejemplo 8. El gel es procesado usando SiverQuest™, de conformidad con los procedimientos generales descritos por el fabricante (Invitrogen). Alternativamente, el gel es procesado usando azul brillante de coomassie o en manchado western como se describe en el ejemplo 8 y 9. Los resultados se dan en la Figura 42.

Ejemplo 50: Caracterización de Nanobodies™ humanizados biespecíficos trivalentes

El TNF60 consiste de 363 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 38,441 DA. El pI es 8.71. El coeficiente de extinción a 280 nm es 1.736.

Espectofotometría de masas

La masa de la proteína se determina en ESI-EM de conformidad con los procedimientos estándares. La masa teórica de

TNF60 es 38,441 Da. La proteína tiene 2 puentes S-S, los cuales deben resultar en una masa de 38,435 Da En ESI-EM. La masa que fue experimentalmente determinada por TNF60 derivado de 3 intervalos de lotes diferentes de 38,433 Da hasta 38,435 Da, difiere máximamente 0.005% con la masa teórica.

Secuenciamiento N-terminal

El secuenciamiento N-terminal se realizó por degradación Edman de conformidad con los procedimientos estándares. El secuenciamiento N-terminal muestra que la secuencia de proteína para los primeros 7 aminoácidos es como sigue: EVQLVES. Esto es consistente con la secuencia de proteína teórica, lo cual indica el procesamiento N-terminal apropiado.

Clasificación Analítica

Las muestras (100 ug) se analizaron en la columna Superdex75 de alta resolución, para caracterizar los diferentes lotes de Nanobody™. La cromatografía de exclusión de tamaño del Nanocuerpo, típicamente proporciona un pico simétrico, con un tiempo de retención de 11.5 min en Superdex75. La absorbancia es típicamente registrada a 280, 254 y 214 nm. La medición de 214 nm permite sensibilidad de detección superior. El tamaño analítico en PBS, proporciona un pico simétrico. No se observan contaminantes. El tiempo de retención observado para 3 lotes diferentes es 11.5-11.55 min. Se muestra un perfil representativo en la Figura 43.

Ejemplo 51: Enlace de TNF60 a TNFα humano en ELISA

La funcionalidad de TNF60, es decir, el enlace a TNFα

humano, se analizó en ELISA como se describe en el ejemplo 10. Los resultados son resumidos en la Figura 44 y demuestran claramente un enlace saturable y dependiente de la dosis de 2 lotes de TNF60 a TNFα humano.

Ejemplo 52: Funcionalidad en ensayo a base de célula

La potencia para neutralizar la actividad citotóxica de TNFα, se analizó en un ensayo a base de célula como se describe en el ejemplo 13. Los resultados son resumidos en la Tabla 42 y en las Figuras 45 y 46.

Los datos muestran que el TNF60 tiene potencia en el intervalo de Enbrel/Etanercept y una potencia 10 veces mejor que Humira/Adalimumab y Remicade/Infliximab.

Ejemplo 53: Enlace de TNF60 a albúmina de suero

El enlace a albúmina de suero Rhesus y humano, se analizó en Biacore como se describe en el Ejemplo 12. Los valores KD, kon y koff, son representados en la Tabla 43. El TNF60 es comparado con TNF24, el cual es el Nanobody™ precursor biespecífico trivalente con bloques de construcción de tipo nativo.

La afinidad de TNF60 para albúmina de suero Rhesus y humana es similar. La afinidad es 2 veces inferior, comparada con la afinidad observada para TNF24, el cual es el tipo análogo de TNF60. El Kon es idéntico para ambas moléculas, pero el Koff es 2 veces superior para TNF60.

Ejemplo 54: Análisis de inmunogenicidad y farmacocinética de Nanocuerpos humanizados biespecíficos trivalentes en ratones

Animales

480

Los ratones DBAI o BALBc fueron calentados bajo una lámpara infrarroja y se inyectaron intravenosamente 200 µl de Nanobody™ (100 µg por ratón) en la cola. Las muestras de sangre de obtuvieron a puntos de tiempo diferentes y haciendo una pequeña incisión en la cola y colectando la sangre en un microtubo. Típicamente, el sangrado se muestreó a t = 15 min, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 14 días. El suero se preparó de conformidad con los procedimientos estándares.

Determinación de la concentración de Nanobody™ (nanocuerpo) en suero de ratón

Se revistió un microtitulador de placa (NUNC, Maxisorb), con 2 µg/ml de neutravidina durante la noche a 4°C. La placa se lavó 5 veces con PBS/0.05% de Tween-20 y se bloqueó por 2 horas a TA con PBS/caseína al 1%. El TNFα humano biotinilado (1/2000 en PBS/0.2% de caseína; 400 ng/ml), se aplicó a las cavidades y se incubó por 1 hora a TA. El Nanobody™ de referencia estándar se aplicó iniciando a una concentración de 5 µg/ml y usando diluciones de 5 veces en PBS que contiene plasma de ratón al 1%. Los Nanobodies™ se dejaron enlazar por 2 horas a TA. La placa se lavó 5 veces y se aplicó anti-Nanocuerpo policlonal de conejo (R23) a una dilución de 2000 veces por una hora a TA. Después de lavar la placa, el enlace se detectó con anti-conejo-HRP policlonal de cabra (DAKO) a una dilución de 3000 veces por una hora a TA, y se tiñó con ABTS/H_2O_2. El OD405 nm fue medido.

Primero se usó ELISA para determinar el intervalo lineal de la referencia estándar. En un segundo ELISA, la

referencia estándar se usó a concentraciones en el intervalo lineal y típicamente usando diluciones de 2 veces. En este segundo ELISA, las muestras de prueba de suero fueron diluidas 100 veces y además, se hicieron diluciones de 5 veces en plasma de ratón al 1%, para determinar la dilución en la cual la muestra de suero proporciona una lectura en el intervalo lineal de la curva estándar. En un tercer ELISA, las muestras de suero son diluidas a una concentración apropiada determinada en el segundo ELISA y usando diluciones de 2 veces para determinación exacta de la concentración de Nanobody™ en las muestras de suero.

Se realizaron experimentos para determinar el perfil de farmacocinética de TNF60 en ratones (n=3). Se alcanzó un valor Cmax de 103,84 $\pm$ 31 µg/ml 15 minutos después de la administración. La vida media (t1/2β) por ser 1.9 días, similar a la vida media de albúmina de suero de ratón, indicando que TNF60 adopta la vida media de albúmina de suero. Los datos son representados en la Figura 47.

Determinación de anticuerpos anti-Nanocuerpos en ratones

Se revistió Nanobody™ a 5 µg/ml en PBS a 4°C durante la noche. La placa se lavó 5 veces con PBS/0.05% de Tween-20 y se bloqueó por 2 horas a TA con PBS/1% de caseína. Las muestras de suero fueron diluidas 100 veces y aplicadas a las cavidades para incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó usando anti-ratón-HRP de conejo policlonal (DAKO, P0260) y usando ABTS como sustrato.

Las muestras de suero fueron diluidas 50 veces y analizadas por la presencia de anticuerpos anti-TNF60 de ratón. La carencia de inmunogenicidad se demostró para TNF60. Los datos

son representados en la Figura 48.

Ejemplo 55: Generación de Nanobodies™ humanizados de vida media prolongada bivalentes

Descripción del vector de expresión de Pichia pastoris

Véase ejemplo 48

Formateado de Nanobodies™ bivalentes

Se establecieron dos reacciones de PCR separadas para amplificar la subunidad de Nanobody™ N-terminal y C-terminal usando los procedimientos como se indica en el WPA-0011. Para la amplificación del Nanobody™ N-terminal, se usaron PiForLong y Rev_30GlySer_L108 como combinación de cebador; para la amplificación del Nanobody™ C-terminal se usaron For_GlySer y PiRevCys1hum o alternativamente, For_GlySer y PiRevCys2hum, introduciendo los sitios de restricción requeridos para formatear y liberar residuos de cisteína requeridos para modificaciones C-terminal.

La reacción de RCP de 1 µl de ADN plásmido (50-100 ng), 1.5 µl de cebador delantero (10 µM → 300 nM), 1.5 µl de cebador inverso (10 µM → 300 nM), 1 µl dNTPs (10 mM → 0.2 mM), 5 µl de amortiguador (10x → 1x), 0.75 µl de enzima (3.5 U/µl → 2.6 U/µl) y 39.25 µl de H_2O con un volumen total de 50 µl, se preparó. Las secuencias cebadoras se proporcionan en la Tabla 44. Se inició un programa de RCP con 2 minutos a 94°C. Se repitió un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C, 30 veces y se siguió por 10 minutos a 72°C. La amplificación se verificó separando 5 µl de la reacción de RCP en gel de agarosa al 2%. El producto de RCP se purificó usando un Kit de Purificación de RCP

QIAquick, de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y se eluyó con 50 µl de amortiguador EB. El fragmento VHH N-terminal se preparó incubando 50 µl de DNA y 2 µl de BamHl (10 U/µl) en el amortiguador apropiado recomendado por el fabricante a 37°C por 1.5 horas. El fragmento de VHH C-terminal, se preparó incubando 50 µl de DNA y 2 µl de BamH1 (10 U/µl) y 2 µl de EcoRI (10 U/µl) en el amortiguador apropiado recomendado por el fabricante a 37°C por horas. Las reacciones de digestión previas se separaron en gel de agarosa al 2%. Las bandas de VHH (350-450 pb), se cortaron por el gel y el ADN se purificó usando el Kit de Extracción de Gel QIAquick, de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna (con un máximo de 400 mg de gel de agarosa por columna) y el ADN unido se eluyó con 50 µl de amortiguador EB. La concentración de ADN se determinó midiendo el OD_{260} (1 unidad de OD = 50 µg/ml). Una mezcla de ligación con un volumen final de 10 µl que contiene 100 ng de vector pPICZαA, linearizado con XhoI/EcoRI, 30 ng de VHH N-terminal, 30 ng de fragmento VHH C-terminal, 1 µl de amortiguador de ligación y 1 µl de ligada (3U), se preparó e incubó por 1 hora a temperatura ambiente. La transformación de *E. coli*, TG1, se realizó usando 2 µl de la mezcla de ligación. Las colonias se analizaron usando RCP como se describe en el documento WPA-0010, pero usando la combinación de cebador AOX1For/AOXIRev. El análisis de secuencia se realizó en clones positivos. La preparación del plásmido se realizó usando un Kit Miniprep de centrifugación Qiaprep (Qiagen), de conformidad con las instrucciones del fabricante y se describe anteriormente. El secuenciamiento se realizó en las instalaciones de secuencias VIB, Antwerp, Bélgica.

Transformación de P. pastoris

Véase Ejemplo 48.

El TNF30 se formateó a Nanobodies™ bivalentes. Se usó como espaciador entre los dos bloques de construcción un enlazador GlySer de 30 AA. Para permitir las modificaciones específicas del sitio C-terminal, se introcujo una cisteína libre, ya sea como el último AA del Nanobody™, o con un espaciador adicional que consiste de GlyGlyGlyCys (SEC ID NO:471).

Ejemplo 56: Expresión y purificación de Nanobodies™ humanizados de vida media prolongada bivalentes

Producción en Pichia Pastoris

Véase Ejemplo 49

Purificación de Nanocuerpos bivalentes

El medio de cultivo se hizo libre de células vía centrifugación y filtración de 0.22 µm. El medio estéril se almacenó a 4°C hasta que es procesado adicionalmente. Los contaminantes de bajo peso molecular se redujeron vía ultra filtración en una membrana de ultrafiltración (UF) de 10kDa (HydroStart Sartcon Slice Casette, Sartorius) como sigue: se concentraron cuatro litros de medio a 0.5-1 litro, después se diluyeron con 5 litros de PBS y nuevamente se concentraron a 0.5 litros. Esta acción se realizó dos veces. Lo retenido de la UF se filtró a través de membranas de 47 mm de nylon, 0.45 µm (Alltech #2024).

En la siguiente etapa, se capturó el Nanobody™ bivalente a partir del medio concentrado vía purificación de afinidad de proteína A (usando MabSelectXtraTM, GE Healtcare). La columna [35x100 mm], se equilibró en PBS y después, la aplicación de muestra se lavó extensivamente con PBS. Se eluyó TNF56 con Glicina [100 mM, pH = 7.5].

Las fracciones eluidas de MabSelectXtraTM, fueron neutralizadas con Tris [1.5M, pH 8.8] y almacenadas a 4°C. Se concentró TNF56 y se purificó vía AEX (A= 10 mM de piperazina, pH 10.8 y B=1M de NaCl en 50 mM de Tris, pH 7.5), usando Source 30Q (GE Healthcare). En este extremo, las fracciones de Nanobody™ fueron diluidas con amortiguador A (10 mM de piperazina, pH 10.8), a una conductividad de 5 mS/cm y el pH se ajustó a 10.8. La columna [25x100 mm], se equilibró en amortiguador A antes de cargar la muestra en la columna. El TNF56 se eluyó con un gradiente de Volumen de Columna 5 (CV). El pH de las fracciones colectadas se ajustó a 7.8 usando 1M de Tris a pH = 7.8.

Pegilación de Nanobodies™ bivalentes expresados en *Pichia pastoris*

Reducción de cisteínas C-terminal

Se agregó Ditiotreitol (DTT, Aldrich Cat 15,046-0) a las fracciones neutralizadas para reducir los puentes de disulfuro potenciales que se forman entre las cisteínas carboxi terminales de los Nanobodies™ (usualmente aproximadamente 20%). Una concentración final de 10 mM de DTT e incubación durante la noche a 4°C, se encuentra por ser óptima. La reducción se evaluó por cromatografía de exclusión de tamaño de analito (SEC). Por lo tanto, 25 µl del Nanobody™ reducido, se agregaron a 75 µl de D-

PBS e inyectaron en una columna Sup75 10/300 GL, equilibrada en PBS de Dulbecco (D-PBS, GibcoTM REF 14190-094).

Se removió el Nanobody™ no reducido y el DTT por SEC preparativa en una columna de grado prep. Huload 20/60 Superdex75 equilibrada en D-PBS.

Se midió la concentración del Nanobody™ reducida, midiendo la absorbancia a 280 nm. Se usó un Espectrofotómetro UV/VIS de Doble Haz Uvikon 943 (método: véase SOP ABL-0038). Las absorciones se midieron en un explorador de longitud de onda de 245-330 nm. Se usaron dos células de precisión hechas de células Suprasil® Quartz (Hellma tipo No:104-QS; trayectoria ligera: 10 mm). Primero, la absorción del blanco se midió a 280 nm colocando dos células llenas por 900 µl de D-PBS. La muestra se diluyó (1/10) agregando 100 µl de la muestra a la primera célula. La absorción de la muestra se midió a 280 nm.

La concentración se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{OD_{280}\text{Muestra-OD280blanco}}{\varepsilon \times 1} \times 10$$

Para TNF55: $\varepsilon = 1.85$

Para TNF56: $\varepsilon = 1.83$.

PEGilación

A Nanobody™ PEGilado, se agregó un exceso molar de 5X de solución PEG40 1 mM recientemente elaborada a la solución de Nanobody™ reducido. (MPEG2-MAL-40K de NEKTAR™.

Los terapéuticos de transformación (2D3YOTO1) Pm = 40,000 g/mol; MPEG2-MAL-60K de Terapéuticos de Transformación NEKTAR™ (2D3YOVO1) Pm = 60,000 g/mol).

La mezcla de Nanobody™-PEG, se incubó por 1 hora a

temperatura ambiente (TA) con agitación suave y después se transfirió a 4°C. La PEGilación se evaluó vía SEC analítico. Por lo tanto, se agregaron 25 µl del Nanobody™ a 75 µl de D-PBS e inyectó en una columna Sup75HR 10/300, equilibrada en D-PBS. El Nanobody™ pegilado es eluido en el intervalo del volumen de exclusión de la columna (>75 kDa).

El Nanobody™ PEGilado y no PEGilado, se separó vía cromatografía de intercambio catiónico (CEX, usando Source30S, GE Healthcare; amortiguador A = 25 mM de ácido cítrico a pH = 4 y B = 1 M de NaCl en BPS). La muestra se diluyó a una conductividad de <5 mS/cm y el pH se ajustó a 4.0. La columna [25 x 100 mm], se equilibró y después la aplicación de muestra se lavó extensivamente con amortiguador A. Se eluyó Nanobody™ pegilado con un gradiente de 3CV. El Nanobody™ colectado fue amortiguador intercambiado a D-PBS por SEC en una columna de grado prep Hiload 26/60 Superdex75, equilibrada en D-PBS.

Finalmente, el Nanobody™, se hizo libre de LPS vía el paso sobre una columna de intercambio aniónico (Source 30Q). La columna (10x100 mm), se sanitizó durante la noche en NaOH [1M] y posteriormente se equilibró en D-PBS libre de endotoxina.

Biotinilación

Para Biotinilar Nanobody™, se agregó un exceso molar de 5X de biotina (EZ-Link® Maleimida-PO2-Biotina, Pierce #21901) de una solución base de 10 mm, al Nanobody™ reducido (véase 5.5.1). La mezcla de Nanobody™ biotinilada, se incubó por 1 hora a TA con agitación suave y después se almacenó a 4°C.

La pureza del Nanobody™ biotinilado, se controló vía SEC analítico. Por lo tanto, se agregaron 25 µl de Nanobody™

biotinilado a 75 µl de D-PBS, y se inyectó en una columna Sup75HR 10/300, equilibrada en D-PBS. A partir del cromatograma obtenido, se podría concluir que la biotina del Nanobody™ no necesita purificación adicional: no se podría detectar dimerización de Nanobody™ vía una oxidación de los sulfhidrilos libres. Un cambio de amortiguador a D-PBS, se hizo por un paso sobre una columna Sephadex G25 Fina (90 ml) de columna de desalación.

Finalmente, el Nanobody™ biotina se hizo libre de LPS por el paso sobre una columna de intercambio aniónico (Source30Q, GE Healtcare). La columna (1 x 10 cm), se sanitizó durante la noche en 1M de NaOH y después se equilibró en D-PBS.

Para determinar la pureza, las muestras de proteína se analizaron en gel de SDS-PAGE al 15%, como se describe en el ejemplo 8 y 49. Los resultados son presentados en la Figura 49 y 50.

Ejemplo 57: Caracterización de Nanobodies™ humanizados de vida media prolongada bivalentes.

Caracterización química

El TNF55 consiste de 260 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 27,100 Da. El pI es de 8.67. El coeficiente de extinción a 280 nm es 1.850.

El TNF56 consiste de 264 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 27,365 Da. El pI es de 8.67. El coeficiente de extinción a 280 nm es 1.830.

Espectrometría de masas

La masa teórica de TNF55 es 27,106 Da. La proteína TNF55-Biotina tiene 2 puentes S-S y una modificación de biotina, la cual debe resultar en una masa de 27,627 Da en ESI-EM. La masa que se determina experimentalmente para TNF55-biotina es 27,627 Da.

La masa teórica de TNF56 es 27,365 Da. La proteína TNF55-Biotina tiene 2 puentes S-S y una modificación de biotina, la cual debe resultar en una masa de 27,886 Da en ESI-EM. La masa que se determina experimentalmente para TNF55-biotina es 27,886 Da.

Secuenciamiento N-terminal

El secuenciamiento N-terminal de TNF56-PEG40, mostró que la secuencia de proteína para los primeros 7 aminoácidos es como sigue: EVQLVES. Esto es consistente con la secuencia de proteína teórica, la cual indica el procesamiento N-terminal apropiado.

Clasificación analítica

La clasificación analítica de TNF56-PEG40 es PBS, proporciona un pico simétrico. No se observaron contaminantes. El tiempo de retención observado es 8.5 ml en Superdex HR 75 y 10.32 ml en Superdex HR 200. Se muestra un perfil representativo en las Figuras 51 y 52.

Ejemplo 58: Funcionalidad en el ensayo a base de célula

La potencia para neutralizar la actividad citotóxica de TNFα, fue analizada en un ensayo a base de células. La potencia se examinó a diferentes concentraciones de Nanobody™, así como también de Enbrel, Humira y Remicade comercialmente disponibles,

en una base molar. A superior EC50 observado, inferior la actividad del compuesto para neutralizar TNFα.

Los resultados son resumidos en la Tabla 45 y las Figuras 53 y 54.

Los datos muestran un incremento en potencia para los Nanobodies™ bivalentes, cuando se comparan con el TNF1 del Nanobodi™ monovalente. La potencia de los derivados de TNF55 es similar a la de los derivados de TNF56, la cual está en el intervalo de Enbrel y 10 veces mejor que el Humira y Remicade.

Ejemplo 59: Análisis de inmunogenicidad y farmacocinética de Nanocuerpos humanizados de vida media prolongada bivalentes en ratones

Véase ejemplo 54.

Los experimentos se realizaron para examinar la vida media de Nanobodies™ pegilados en ratones. La vida media de TNF56-PEG40 bivalente, se comparó con la vida media de TNF56-PEG60. Ambos Nanobodies™ tienen vida media comparable de ~ 2 días. Los resultados están presentados en la Figura 55.

Además, la vida media del 3E-3E bivalente pegilado, se exploró. La vida media del 3E-3E-PEG20, se comparó con la vida media de 3E-3E-PEG40 después de la administración intravenosa de 100 µg de los Nanobodies™. 3E-3E-PEG20, tienen una vida media de 17 horas, mientras el 3E-3E-PEG40, tiene una vida media de 2.1 días, comparable con la vida media de 3E-3E-MSA21. Los resultados están presentados en la Figura 56.

Las muestras de suero fueron diluidas 100 veces y analizadas para determinar la presencia de anticuerpos anti-TNF56-PEG40 o anti-TNF56-PEG60. La carencia de inmunogenicidad se

demostró para ambas moléculas. Los datos se presentan en la Figura 57.

Ejemplo 60: Eficacia de Nanocuerpo anti-TNF-α TNF60 (TNF60) en prevención de poliartritis crónica

Las líneas de ratón transgénico que portan y expresan el gen del factor necrosis del tumor humano 3'-modificado (hTNF-alfa; caquectina), se usaron como un modelo para estudiar la eficacia de TNF60 (TNF60) en la prevención del desarrollo de artritis (EMBO J. 10, 4025-4031). Estos ratones han sido mostrados por desarrollar poliartritis crónica con 100% de incidencia en cuatro a siete semanas de edad.

A partir de la tercera semana de edad, camadas de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de inicializar el estudio, el peso corporal promedio se calculó para cada grupo. A partir de entonces, durante el estudio completo los pesos del animal se registraron una vez por semana para cada grupo.

Para probar la eficacia de TNF60 en la prevención de poliartritis crónica, se dieron inyecciones intraperitoneales dos veces por semana a cada animal de un grupo particular de conformidad con el siguiente esquema:

-Grupo 1 (control negativo): salina amortiguada de fosfato (PBS) (amortiguador de formulación).

-Grupo 2 (Tratamiento de Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 30 mg/kg.

-Grupo 3 (Tratamiento de Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg.

-Grupo 4 (Tratamiento de Nanocuerpo): TNF60 a una dosis

final de 3 mg/kg.

-Grupo 5 (1er. control positivo): Enbrel a una dosis final de 30 mg/kg.

-Grupo 6 (1er. control positivo): Enbrel a una dosis final de 10 mg/kg.

-Grupo 7 (2do. control positivo): Remicade a una dosis final de 30 mg/kg.

-Grupo 8 (2do. control positivo): Remicade a una dosis final de 10 mg/kg.

-Grupo 9 (2do. control positivo): Remicade a una dosis final de 3 mg/kg.

Para cada grupo, los datos de inyección y volúmenes fueron indicados.

Las inyecciones continuaron por varias semanas. Durante este periodo, los registros clínicos fueron registrados observando cambios macroscópicos en la morfología de articulación para cada animal.

A 10 semanas de edad, todos los ratones fueron sacrificados y se colectaron las articulaciones y suero. El suero se almacenó a -70°C y las articulaciones de la tobillo fueron conservadas en formalina.

Para los grupos seleccionados, las articulaciones de tobillo fueron embebidas en parafina y seccionadas. Las secciones de articulación del tobillo fueron subsecuentemente usadas para evaluación histopatológica del progreso de la enfermedad.

Los resultados están representados en la Figura 58.

Ejemplo 61: Eficacia de Nanocuerpo TNF60 anti-TNF-α (TNF60) en tratamiento terapéutico de poliartritis crónica

Las líneas de ratón transgénico que portan y expresan el gen del factor necrosis del tumor humano 3'-modificado (hTNF-alfa; caquectina), se usaron como un modelo para estudiar la eficacia de TNF60 (TNF60) en el tratamiento terapéutico de artritis (EMBO J. 10, 4025-4031). Estos ratones han sido mostrados por desarrollar poliartritis crónica con 100% de incidencia en cuatro a siete semanas de edad.

A partir de la sexta semana de edad, camadas de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de inicializar el estudio, el peso corporal promedio se calculó para cada grupo. A partir de entonces, durante el estudio completo los pesos del animal se registraron una vez por semana para cada grupo.

Para probar la eficacia de TNF60 en el tratamiento terapéutico de poliartritis crónica, se dieron inyecciones intraperitoneales dos veces por semana a cada animal de un grupo particular de conformidad con el siguiente esquema:

-Grupo 1 (control negativo): salina amortiguada de fosfato (PBS) (amortiguador de formulación).

-Grupo 2 (Tratamiento de Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 30 mg/kg.

-Grupo 3 (Tratamiento de Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg.

-Grupo 4 (1er. control positivo): Enbrel a una dosis final de 30 mg/kg.

-Grupo 5 (2do. control positivo): Remicade a una dosis final de 30 mg/kg.

Para cada grupo, los datos de inyección y volúmenes fueron indicados.

Las inyecciones continuaron por varias semanas. Durante este periodo, los registros clínicos fueron registrados observando cambios macroscópicos en la morfología de articulación para cada animal.

A 13 semanas de edad, todos los ratones fueron sacrificados y se colectaron las articulaciones y suero. El suero se almacenó a -70°C y las articulaciones de la tobillo fueron conservadas en formalina.

Para los grupos seleccionados, las articulaciones de tobillo fueron embebidas en parafina y seccionadas. Las secciones de articulación del tobillo fueron subsecuentemente usadas para evaluación histopatológica del progreso de la enfermedad.

Los resultados están representados en la Figura 59.

Ejemplo 62: Efecto de formateado en la eficacia de un Nanocuerpo anti-TNFα en la prevención de poliartritis crónica

Las líneas de ratón transgénico que portan y expresan el gen del factor necrosis del tumor humano 3'-modificado (hTNF-alfa; caquectina), se usaron como un modelo para estudiar la eficacia de un Nanocuerpo anti-TNFα formateado en diferentes formas, en la prevención de poliartritis crónica (EMBO J. 10, 4025-4031). Estos ratones han sido mostrados por desarrollar poliartritis crónica con 100% de incidencia en cuatro a siete semanas de edad.

A partir de la tercera semana de edad, camadas de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de inicializar el estudio, el peso corporal promedio se calculó para cada grupo. A partir de entonces, durante el estudio completo los pesos del animal se registraron una vez por semana

para cada grupo.

Para probar la eficacia del Nanocuerpo anti-TNFα en diferentes formatos para la prevención de poliartritis crónica, se dieron inyecciones intraperitoneales dos veces por semana a cada animal de un grupo particular de conformidad con el siguiente esquema:

-Grupo 1 (control negativo): salina amortiguada de fosfato (PBS) (amortiguador de formulación).

-Grupo 2 (formato de Nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg.

-Grupo 3 (formato de Nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 2.5 mg/kg.

-Grupo 4 (formato de Nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 1 mg/kg.

-Grupo 5 (formato de Nanocuerpo 2): TNF-56-PEG40 a una dosis final de 10 mg/kg.

-Grupo 6 (formato de Nanocuerpo 2): TNF-56-PEG40 a una dosis final de 1.8 mg/kg.

-Grupo 7 (formato de Nanocuerpo 2): TNF-56-PEG40 a una dosis final de 0.7 mg/kg.

-Grupo 8 (formato de Nanocuerpo 3): TNF-56-biotina a una dosis final de 1.8 mg/kg.

-Grupo 9 (formato de Nanocuerpo 4): TNF-30 a una dosis final de 1 mg/kg.

-Grupo 10 (formato de Nanocuerpo 5): TNF1 a una dosis final de 1 mg/kg

-Grupo 11 (1er. Control positivo): Enbrel a una dosis final de 10 mg/kg

-Grupo 12 (2do. Control positivo): Remicade a una dosis

final de 10 mg/kg.

Para cada grupo, los datos de inyección y volúmenes fueron indicados.

Las inyecciones continuaron por varias semanas. Durante este periodo, los registros clínicos fueron registrados observando cambios macroscópicos en la morfología de articulación para cada animal.

A 10 semanas de edad, todos los ratones fueron sacrificados y se colectaron las articulaciones y suero. El suero se almacenó a -70°C y las articulaciones de la tobillo fueron conservadas en formalina.

Para los grupos seleccionados, las articulaciones de tobillo fueron embebidas en parafina y seccionadas. Las secciones de articulación del tobillo fueron subsecuentemente usadas para evaluación histopatológica del progreso de la enfermedad.

Los resultados están representados en la Figura 60.

Ejemplo 63: Estudio de farmacocinética de Nanocuerpos TNF60 anti-TNF-α (TNF60) y TNF56-PEG40 en monos Rhesus

Monos Rhesus reproducidos cautivos (*Macaca mulatta*), se usaron para determinar el perfil de farmacocinética de TNF60 y TNF56-PEG40.

Se usaron dieciséis animales en este estudio (ocho hembras y ocho machos) y se dividieron en cuatro grupos (dos machos y dos hembras por grupo). Todos los animales pesaron aproximadamente 5 kg y están libres de enfermedad por al menos, seis semanas antes del uso. El Sniff® Pri vegetarisch V3994 sirve como alimento. Sesenta g/kg de b.w. son ofreció a cada mono. El residuo es removido. A intervalos regulares (al menos dos veces

por año), el alimento se analizó basado en EPA/USA por contaminantes por LUFA-ITL. El agua de llave es ofrecida a albedrío. Los animales en cada grupo de tratamiento son alojados en un bloque de varias jaulas adyacentes dentro de la unidad del mono. Los monos son mantenidos individualmente en jaulas de acero V_2A con un tamaño de 90 cm x 82 cm x 96 cm. La temperatura ambiente es mantenida a 23°C $\pm$ 3°C (intervalo máximo) y la humedad relativa a 60% $\pm$ 20% (intervalo máximo). Las desviaciones a partir del intervalo máximo causadas por ejemplo, durante el procedimiento de limpieza, son considerados en SOPs. Los cuartos son iluminados y oscurecidos por periodos de 12 horas cada uno.

Los dos grupos son infundidos con TNF60 y dos grupos son infundidos con TNF56-PEG40. Las infusiones intravenosas de TNF60 y TNF56-PEG40 (disuelto en PBS) en la vena cefálica del brazo derecho e izquierdo, usando catéteres permanentes y una bomba de infusión TSE (véase posteriormente), se da una dosis fija de 2 mg/kg.

Se realizaron cuatro administraciones únicas, separadas por un periodo de lavado de al menos, catorce días. Después de la última administración, el periodo de seguimiento es al menos, de ocho semanas. Dos de los cuatro grupos son tratados con TNF60 ó TNF56-PEG40 en combinación con metotrexato (MTX) (disuelto en PBS). El grupo 2 es tratado con TNF60 y MTX; el grupo 4 es tratado con TNF56-PEG40 y MTX. El MTX es dosificado semanalmente intramuscularmente a 0.2 mg/kg. En los días de administración, el MTX es dado aproximadamente 30 minutos antes de la administración. La dosificación inicia en la primera administración de Nanocuerpo y continuará a través de las ocho semanas de lavado después de la cuarta dosis. Existen catorce

administraciones MTX únicas, separadas por un periodo de lavado de al menos, una semana, iniciando con la primera administración de punto de prueba.

Ejemplo 64: Estudios de fibroblastos derivados del sinovio

En este estudio, se valoró la capacidad de los biológicos anti-TNF, ALX0071 y Etanecerpt, para atenuar la producción de IL-6 inducida por TNF-α por fibroblastos derivados del sinovio RA.

Aislamiento de fibroblastos sinoviales

Tejidos de articulación sinovial a partir de pacientes RA consentidos, se almacenó en medio a base de DMEM, con antibióticos a 4°C por hasta 96 horas después de la cirugía de reemplazo de articulación. Las células sinoviales fueron aisladas a partir del sinovio disectado por digestión de colagenasa a 37°C por 2 horas. La suspensión celular resultante entonces se lavó por una serie de etapas de centrifugación y resuspensión y las células resultantes entonces se cultivaron a 37°C en medio de cultivo a base de DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v). Los fibroblastos resultantes se usaron para el siguiente experimento ya sea en el segundo o tercer paso. Las células de cuatro donadores, fueron usadas en experimentos individuales. Los fibroblastos fueron sembrados en placas de poliestireno de fondo plano de 96 cavidades a 1.5×10^4 células en un volumen final de 250 µl de medio de cultivo a base de DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v) por cavidad y cultivadas durante la noche.

Estimulación del fibroblasto sinovial

Las células son entonces incubadas por 72 horas en medio de cultivo a base de DMEM, suplementadas con TNFα a 50 ng por ml (3 nM (R&D Systems 210-TA/CF) solo o en la presencia de dosis incrementadas de ALX0071 (0.575 hasta 1920 ng por ml; 0.015 hasta 50 nM) o Etanercept (Wyeth Labs; 3.75 a 11250 ng por ml; 0.025 hasta 75 nm). El volumen final en cada cavidad fue de 250 µl y cada valoración se realizó por triplicado. Después de 72 horas, el medio sobrenadante se removió y almacenó a -40°C antes del análisis por IL-6 ELISA (R&D Systems). La inhibición de producción de IL-6 inducida por TNF-α, se determinó y los valores IC_{50} fueron calculados para tanto ALX0071 como Etanercept.

Sumario de resultados

La producción de IL-6 inducida por TNFα es dependientemente reducida de dosis tanto de ALX10071 como Etanercept, por fibroblastos derivados del sinovio RA de cuatro donadores. Existe una potencia similar entre los dos reactivos bajo estas condiciones de ensayo.

Ejemplo 65: Estudios de bolsas de Aire Murina

En este estudio, se valoró la capacidad de los biológicos anti-TNF, ALX0071 y Etancerpt, para atenuar la infiltración celular inducida por TNFα en una bolsa de aire de murina.

Creación de Bolsas de Aire

Las bolsas de aire se formaron por inyección sub-cutánea (s.c.) de 2.5 ml de aire estéril en la superficie dorsal de ratones machos anestesiados C57B1/6/J (25-30 g, Harlan). La

500

bolsa se reinfló inyectando 2.5 ml de aire estéril 3 días después.

Estimulación de TNFα

Seis días después de la creación inicial de la bolsa de aire, los animales fueron anestesiados y la bolsa inyectada con 1 ml de vehículo de carboximetilcelulosa al 0.5% (CMC), que contiene 0.1 µg de TNFα recombinante humana (R&D Systems, 210-TA-050/CF). En los otros tres grupos de animales, se inyectó ALX0071 (0.0625, 0.125 y 0.25 mg/kg) s.c. 19 horas antes de la inyección de TNFα. Se inyectó un segundo grupo de tres animales (s.c.) con Etanercept (Wyeth Labs, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/kg), inmediatamente antes de la inyección de TNFα.

24 Horas después de la inyección por TNFα, los ratones fueron elegidos con una concentración elevada de CO_2. Las bolsas fueron lavadas con 2 ml de PBS estéril libre de endotoxina enfriado en huelo que contiene 5 IU/ml de heparina. Los volúmenes fueron registrados y se separaron 0.5 ml de alícuotas para conteo de la población de células blancas de la sangre totales (WBC) en un contador celular Sysmex XT-Vet. El error estándar y la media de los conteos WBC totales medios (SEM) para cada grupo, fueron calculados por ml de fluido de lavado retirado. Los análisis estadísticos fueron por ANOVA con datos no transformados y posteriores a la prueba Kruskal-Wallis.

Sumario de resultados

Tanto ALX0071 como Etanercept, atenuaron la infiltración de WBC inducida por TNFα en las bolsas de aire (Tabla). Mientras esta atenuación alcanza significancia

estadística en tanto 0.125 ($P<0.01$) como 0.25 mg/kg ($P<0.05$). Los grupos de dosis de ALZ0071, no se observó significancia estadística con cualquiera de los grupos de dosis de Etanercept.

Tabla 8

Nombre	SEC ID NO	Secuencia
PMP1C2(TNF1)	52	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
PMP1G11	53	QVQLQESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFDFGVSWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS
PMP1H6	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDFSVSWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLIPEDTA LYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS
PMP1G5(TNF2)	55	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
PMP1H2	56	QVKLEESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSDYSGYTYTVGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNNLE PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
PMP3G2	57	AVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSDYSGYTYTVGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNNLE PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
PMP1D2	58	AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGK EREFVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLMNCLKPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVEAYNYWGQGTQVTVSS
PMP3D10	59	QVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGRSFTGYYMGWFRQAPGKERQ LLASISWRGDNTYYKESVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTNWGQGTQVTVSS
PMP5F10(TNF3)	60	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
PMP6A8(ALB2)	61	AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDLNLMGWYRQGPGNERE LVATCITVG.DSTNYADSVKGRFTISMDYTKQTVYLHMNSLRPEDT GLYYCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS
PMP6B4	62	EVQLVESGGGLVQEGGSLRLACAASERIWDINLLGWYRQGPGNERE LVATITVG.DSTSYADSVKGRFTISRDYDKNTLYLQMNSLRPEDTG LYYCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS
PMP6A6(ALB1)	63	AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
PMP6C1	64	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSFGMSWVRQYPGKEPE WVSSINGRGDDTRYADSVKGRFSISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA EYYCTIGRSVSRSRTQGTQVTVSS
PMP6G8	65	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKDQE WVSAISADSSTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLYLEMNSLKPEDTA VYYCVIGRGSPSSPGTQVTVSS

502

PMP6A5	66	QVQLAESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFGSFGMSWVRQAPGEGLE WVSAISADSSDKRYADSVKGRFTISRDNAKKMLYLEMNSLKSEDTA VYYCVIGRGSPASQGTQVTVSS
PMP6G7	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRVAPGKGLE RISRDISTGGGYSYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDT ALYYCAKDREAQVDTLDFDYRGQGTQVTVSS
NC55TNF_S1C4	105	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASQIIFGSHVAAWFRQAPGRERE FVAEIRPSGDFGPEGEFEHVTASLKGRFTIAKNSVDNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCAAAPYRGGRDYRWEYEYEYWGQGTQVTV
NC55TNF_S1C3	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKNAGSTSNAYATGWFRRAPGKERE FVAGIQWSGGDAFYRNSVKGRFRITRDPDNTVYLQMNDLKPEDTAI YYCAQKLSPYYNDFDSSNYEYWGQGTQVTV
NC55TNF_S2C1	107	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAVSGQLFSTNDVGWYRRAPGKQRE LVATITDDGTTDYGDDVKGRFVISREGEMVYLEMNSLKPEDTAVYY CNINRLRSTWGIRYDVWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S2C5	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSITSMTWVRQAPGKFEE WVSFINSDGSSTTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA MYYCGRRGYGRDRSKGIQVTVAS
NC55TNF_S3C7	109	EVQLVESGGGTVQAGDSLRLSCAASGRSFSSVAMGWFRQAPGKQRE FLAGVGYDGSSIRYAESVKGRFTIARGNRESTVFLQMENLKPEDTA VYFCTAEPIGAYEGLWTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S3C1	110	XXXXVESGGGLMQPGGSLKLSCAASGFMFSDSAMGWFRQAPGKERE FVATISWNGGSSSYADFVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNGLTPQDTA IYYCAGSYSNGNPHRFSQYQYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1B2	111	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGTYAMGWFRQAPGKERE FVAAISWGGGSIVYAESAKGRFTISRDNAKNTMYLQMDSLKPEDTA VYYCAAANNIATLRQGSWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1D2	112	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRNFVTYAMSWFRRAPGKERE FVASISWSGDTTYYSNSVKGRFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTA DYYCAVVQVIDPSWSGVNLDDYDYLGSGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1E2	113	EVQLVESGGRLVQPGGSLRLSCKNAGSTSNAYATGWFRRAPGKERE FVAGIQWSGGDAFYRNSVKGRFRITRDPDNTVYLQMNDLKPEDTAI YYCAQKLSPYYNDFDSSNYEYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1G2	114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASATISSIVMLGWYRQAPGKQRE WVASITIGSRTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV YFCNAVPPRDDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2A2	115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGQTSSSYDMGWFRQAPGEGRE FVARISGSDGSTYYSDRAKDRFTISRDNTKNMVYLQMDRLKPDDTA VYYCRVPRYENQWSSYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2C2	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSTYDMSWVRQAPGKGLE WVSGIDSGGGSPMYVDSVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCAKFSTGADGGSWYWSYGMDSWGKGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2F2	117	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASERSSNRYNMAWFRQAPGKERE FLARVDVSGGNTLYGDSVKDRFTVSRINGKNAMYLQMNNLKPEDTA IYYCAAGGWGTTQYDYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC10	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCVSSGCTFSAYSMTWVRQAPGKA EEWVSFINSDGSSTTYADSVNGRFKISRDNAKKTLYLQMNSLGPED TAMYYCQRRGYALDRGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC11	119	EVQLVESGGGLVQAGDSLTLSCASSGRGFYKNAMGWFRQPPGKERE FVASIKWNGNNTYYADSVRGRFTISRGNAKNTENTVSLQMNSLKPE DTADYYCAADSSHYSYVYSKAYEYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC1	120	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVFSGFAFSASSMAWVRQAPGKYEE WVSFINSDGSSTTYADSVQGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTA MYYCGRRGYGRDRSQGIQVTVSS
NC55TNF_NC2	121	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE FVAAISWSGTITNYADSVKGRFTISRDNGKNTVHLQMNSLKPEDTA VYHCAVVQPYSGGDYYTGVEEYDYWGXGTQVTVSS

NC55TNF_NC3	122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSATSMTWVRQAPGKAEE WVSFINSDGSSTTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDDLQSEDTA MYYCGRRGYGRDRSRGIQVTVSS
NC55TNF_NC5	123	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGAFSNYDVGWFRQAPGEGRE IVARISGSGDSTYSSNRAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKREDTA VYYCRAARYNGTWSSNDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC6	124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCECVSSGCTFSAYSMTWVRQAPGKA EEFVSFINSDGSSTTYANSVNGRFKISRDNAKKTLYLQMNSLGPED TAMYYCQRRGYALDRGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC7	125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYYDEPVKGRFTISRDKAQNTVYLQMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC8	126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSTTSMTWVRQAPGKFEE WVSFINSDGSSTTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA MYYCGRRGYGRDRSKGIQVTVSS
NC55TNF_S2C2	127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGVKVNDMGWYRQAPGKERE LVATITDDGRTNYEDFAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLLPEDTAV YYCNARTYWAHLPTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S1C6	128	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFGSVAMGWFRQAPGKERE FVAAIGYDGNSIRYGDSVKGRFTISRDNIKNTMYLEMENLNADDTA RYLCAAEPLARYEGLWTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S3C2	129	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCTTSTRTNDRFNMAWFHQAPGKDRE FVSRIDVAGYNTAYGDFVKGRFTVSRDSAENTVVLQMNSLRPEDTG VYYCAAGGWGISQSDYDLWGQGTQVTVSS

503

Tabla 9

nanocuerpo	Clase	Koff estimado (1/s)
PMP5 F10	III	2,63E-04
PMP1 G5	II	3,59E-04
PMP1 C2	I	4,39E-04
PMP1 G11	I	1,15E-03
PMP1 H6	I	2,14E-03
PMP1 H2	II	3,65E-03
PMP3 G2	II	1,09E-02

Tabla 10

Nanocuerpo	Secuencia de línea germinal	diferencias #AA/ #AA toal	%AA de identidad
ALB1	DP51/DP53	13/87	85.1
ALB2	DP54	26/87	70.2
TNF1	DP51/DP53	6/87	93.2
TNF2	DP54	16/87	81.7
TNF3	DP29	18/87	79.4

Tabla 11

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/l)
ALB1	corto/37°C	18
ALB2	corto/37°C	4
TNF1	corto/37°C	8.3
TNF2	corto/37°C	5
TNF3	corto/37°C	0.8

Tabla 12

	50% enlace (ng/ml)	
ID	TNFα humano	TNFα Rhesus
TNF1	12	12
TNF2	20	>3000
TNF3	18	16

Tabla 13

.	50% de inhibición (ng/ml)	
ID	TNFα humano	TNFα Rhesus
TNF1	530	220
TNF2	3500	>5000
TNF3	100	100

Tabla 14

TNFα humano	Kd (1/s)
TNF1	1,05E-03
TNF2	1,33E-03
TNF3	3,02E-04

Tabla 15

		Albúmina humana	Albúmina Rhesus	Albúmina de ratón
ALB1	KD (nM)	0,57	0,52	6,5
	ka (1/Ms)	1,11E+06	1,05E+06	1,11E+06
	kd (1/s)	6,30E-04	5,46E-04	7,25E-03
ALB2	KD (nM)	0,092	0,036	15,7
	ka (1/Ms)	8,15E+05	1,94E+06	1,95E+05
	kd (1/s)	7,52E-05	7,12E-05	3,07E-03

505

Tabla 16:

Ensayo: *L929s + Act D (5000c/w)*

TNF: TNFα humano @ *0.5ng/ml*

		EC_{50} en nM			potencia relativa	
Nanocuerpo		media	desv. est.	#	media	desv.est.
TNF1	1C2	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF2	1G5	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF3	5F10	0.224	0.133	14	0.048	0.019
Enbrel		0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira		0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade		0.083	0.037	45	0.103	0.058

ensayo: *L929s + Act D (5000c/w)*

TNF: TNFα *rhesus* @ *0.5ng/ml*

		EC_{50} en nM			potencia relativa	
Nanocuerpo		media	desv.est.	#	media	desv.est.
TNF1	1C2	0.693	0.305	9	0.015	0.009
TNF2	1G5	>50		9		
TNF3	5F10	0.602	0.283	9	0.017	0.010
Enbrel		0.009	0.003	7	1	0.000
Humira		0.071	0.025	8	0.103	0.059
Remicade		>6.7		7		

Tabla 17

%	Sin tratar	TA	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF1	100	98	98	98	98	95	92	90
TNF2	100	99	100	99	97	96	63	50
TNF3	100	96	97	98	96	94	75	70
ALB1	100	101	102	101	100	64	94	90
ALB2	100	100	102	100	100	28	8	17

Tabla 18

nanocuerpo	temp en °C	EC_{50} en nM	#	potencia relativa
TNF1	control	0,916	1	0,013
92#2302nr1.TNF1	TA	0,873	1	0,014
	37	0,901	1	0,013
	50	0,908	1	0,013
	60	0,891	1	0,013
	70	1,218	1	0,010
	80	2,655	1	0,004
	90	5,797	1	0,002
TNF2	control	2,500	1	0,005
92#2302nr2.TNF2	TA	2,165	1	0,005
	37	2,212	1	0,005
	50	2,241	1	0,005
	60	1,782	1	0,007
	70	2,487	1	0,005
	80	2,818	1	0,004
	90	6,135	1	0,002
TNF3	control	0,278	1	0,043
92#2302nr3.TNF3	TA	0,289	1	0,041
	37	0,295	1	0,040
	50	0,290	1	0,041
	60	0,281	1	0,042
	70	0,293	1	0,040
	80	0,576	1	0,021
	90	0,861	1	0,014

507

Tabla 19

Nombre	SEC ID NO	Secuencia
GS9	68	GGGGSGGGS
GS30	69	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
TNF1-GS9-TNF1(TNF4)	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARSPSGFNRG QGTQVTVSS
TNF2-GS9-TNF2(TNF5)	71	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGS QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF3-GS9-TNF3(TNF6)	72	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERELLGNIS WRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF1-GS30-TNF1(TNF7)	73	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF2-GS30-TNF2(TNF8)	74	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKG RFTISRDIAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYN YWGQGTQVTVSS
TNF3-GS30-TNF3(TNF9)	75	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSN YYMGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKN TIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF30-30GS-TNF30-C (TNF 55)	419	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsgggg gsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSC
TNF30-30GS-TNF30-gggC (TNF56)	420	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsgggg gsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSgggC

Tabla 20

ID	Formato	Enlazador
TNF4	TNF1-TNF1	9 AA GlySer
TNF5	TNF2-TNF2	9 AA GlySer
TNF6	TNF3-TNF3	9 AA GlySer
TNF7	TNF1-TNF1	30 AA GlySer
TNF8	TNF2-TNF2	30 AA GlySer
TNF9	TNF3-TNF3	30 AA GlySer

Tabla 21

Nanobody™	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/L)
TNF4	ON/28°C	3.2
TNF5	corto/37°C	5.5
TNF6	corto/37°C	1.19
TNF7	ON/28°C	2.7
TNF8	corto/37°C	6.6
TNF9	ON/28°C	1.3

Tabla 22

	50% de inhibición (ng/ml)
ID	TNFα Humano
TNF4	13
TNF5	6.3
TNF6	30
TNF7	16
TNF8	23
TNF9	18

509

Tabla 23

ensayo: *L929s + Act D (5000c/w)*

TNF: *TNFa* humano *@ 0.5ng/ml*

	EC_{50} en nM			potencia relativa	
Nanocuerpo	media	desv.est.	#	media	desv.est.
TNF4	0.236	0.049	4	0.033	0.012
TNF5	0.020	0.010	9	0.566	0.275
TNF6	0.078	0.047	8	0.179	0.168
TNF7	0.013	0.005	8	0.673	0.211
TNF8	0.007	0.002	2	1.240	0.137
TNF9	0.012	0.005	6	0.729	0.242
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

ensayo: *L929s + Act D (5000c/w)*

TNF: *TNFa rhesus @ 0.5ng/ml*

	EC_{50} en nM			potencia relativa	
Nanocuerpo	Media	desv.est	#	media	desv.est
TNF4	0.141	0.025	4	0.065	0.015
TNF5	35.000	16.000	5	0.000	0.000
TNF6	0.398	0.074	6	0.024	0.003
TNF7	0.011	0.005	4	0.860	0.142
TNF8	1.026	0.444	2	0.010	0.001
TNF9	0.038	0.012	4	0.249	0.032
Enbrel	0.009	0.003	7	1.000	0.000
Humira	0.071	0.025	8	0.103	0.059
Remicade	>6.7		7		

Tabla 24

%	sin tratar	TA	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF4	100	99	99	99	98	55	34	17
TNF5	100	99	101	99	98	92	26	22
TNF6	100	103	104	103	105	99	7	7
TNF7	100	100	100	98	96	66	33	40
TNF8	100	99	100	99	100	89	11	8
TNF9	100	101	101	101	101	99	17	18

510

Tabla 25

Nombre	SEC ID NO	Secuencia
TNF13(TNF1 HUM1)	76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF14(TNF1 HUM2)	77	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSS
TNF15(TNF2 HUM1)	78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF16(TNF2 HUM2)	79	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF17(TNF2 HUM3)	80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF18(TNF2 HUM4)	81	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF19(TNF2 HUM5)	82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTLVTVSS
TNF20(TNF3 HUM1)	83	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF21(TNF3 HUM2)	84	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF22(TNF3 HUM3)	85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKTEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF23(TNF3 HUM4)	86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTLVTVSS
ALB3(ALB1 HUM1)	87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB4(ALB1 HUM2)	88	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB5(ALB1 HUM3)	89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS

511

Tabla 26

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/L)
TNF13	ON/28°C	8.8
TNF14	ON/28°C	7
TNF15	Corto/37°C	7.6
TNF16	Corto/37°C	8.7
TNF17	Corto/37°C	7.2
TNF18	Corto/37°C	4.8
TNF19	Corto/37°C	8
TNF20	ON/28°C	3.5
TNF21	ON/28°C	7.5
TNF22	ON/28°C	6
TNF23	ON/28°C	2.8
ALB3	ON/28°C	11.8
ALB4	ON/28°C	9
ALB5	ON/28°C	11.7

Tabla 27

ensayo: ***L929s + Act D (5000c/w)***

TNF: ***TNFa* humano @ *0.5ng/ml***

	EC_{50} en nM			relative potency	
Nanocuerpo	media	desv.est	#	media	desv.est
TNF1	**0.707**	**0.265**	**14**	**0.015**	**0.007**
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
TNF2	**1.412**	**0.622**	**14**	**0.007**	**0.002**
TNF15	1.669	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	1.898	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	3.023	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	1.508	0.481	4	0.004	0.001
TNF19	2.191	0.941	4	0.001	0.001
TNF3	**0.224**	**0.133**	**14**	**0.048**	**0.019**
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.044	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.044	0.011
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

S12

Tabla 28

%	Sin tratar	TA	37C	50C	60C	70C	80C	90C
TNF13	100	104	99	98	99	84	93	93
TNF14	100	98	101	95	99	96	99	90
TNF15	100	100	91	99	95	90	59	46
TNF16	100	97	102	101	94	101	58	48
TNF17	100	102	98	100	90	90	69	59
TNF18	100	100	101	97	91	93	63	50
TNF19	100	102	111	98	92	91	60	49
TNF20	100	94	93	93	93	92	85	67
TNF21	100	98	99	101	98	96	36	40
TNF22	100	102	101	105	99	93	25	31
TNF23	100	98	97	99	97	98	87	55
ALB3	100	100	99	98	25	18	60	62
ALB4	100	100	100	100	99	29	61	55
ALB5	100	100	100	99	94	32	61	48

Tabla 29

Nombre	SEC ID NO	Secuencia
TNF1-9GS-ALB1-9GS-TNF1(TNF24)	90	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF2-9GS-TNF2-9GS-ALB1(TNF25)	91	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGS EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGS EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
TNF3-9GS-ALB1-9GS-TNF3(TNF26)	92	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLSL SCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIYYKDSVKG RFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS
TNF1-30GS-TNF1-9GS-ALB1(TNF27)	93	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGTQVTVSS
TNF3-30GS-TNF3-9GS-ALB1(TNF28)	94	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSSGGGGSEVQVVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSN YYMGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKN TIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWV RQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
TNF30-9GS-ALB8-9GS-TNF30 (TNF60)	417	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSggggsgggsEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTLVTVSSggggsgggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSS

S13

TNF33-9GS-ALB8-9GS-TNF33 (TNF62)	418	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTLVTVSSggggsgggsEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSSggggsgggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIYYKDSVKG RFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTY WGQGTLVTVSS

Tabla 30

ID	Formato
TNF24	TNF1-9GS-ALB1-9GS-TNF1
TNF25	TNF2-9GS-TNF2-9GS-ALB1
TNF26	TNF3-9GS-ALB1-9GS-TNF3
TNF27	TNF1-30GS-TNF1-9GS-ALB1
TNF28	TNF3-30GS-TNF3-9GS-ALB1

Tabla 31

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/L)
TNF24	ON/28°C	1.7
TNF25	corto/37°C	0.445
TNF26	corto/37°C	0.167
TNF27	ON/28°C	2.2
TNF28	corto/37°C	1

Tabla 32

ensayo: ***L929s + Act D (5000c/w)***

TNF: ***TNFa*** humano ***@ 0.5ng/ml***

	EC_{50} en nM			potencia relativa	
Nanocuerpo	media	desv.est	#	media	desv.est
TNF24	0.011	0.003	11	0.878	0.248
TNF25	0.018	0.008	14	0.603	0.243
TNF26	0.020	0.009	14	0.583	0.210
TNF27	0.012	0.003	3	0.810	0.037
TNF28	0.021	0.008	6	0.548	0.360
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 33

Albúmina humana	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
6A6 (ALB1)	0,57	1,11E+6	6,30E-4
1C2-GS-6A6-GS-1C2 (TNF24)	11	2,26E+05	2,48E-03
1G5-GS-1G5-GS-6A6 (TNF25)	7,2	2,91E+05	2,10E-03
5F10-GS-6A6-GS-5F10 (TNF26)	7,3	2,81E+05	2,05E-03
1C2-GS6-1C2-GS-6A6 (TNF27)	8,9	3,19E+05	2,84E-03
5F10-GS6-5F10-GS-6A6 (TNF28)	14	1,55E+05	2,13E-03

Tabla 34

%	Sin tratar	TA	37C	50C	60C	70C	80C	90C
TNF24	100	100	99	98	5	3	8	18
TNF25	100	nd	103	102	95	5	4	6
TNF26	100	109	115	112	107	10	8	10
TNF27	100	102	103	102	22	9	26	34
TNF28	100	97	99	99	66	3	6	10

515

Tabla 35

Nombre	SEC ID NO	Secuencia
TNF29(TNF1 HUM1)	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSS
TNF30(TNF1 HUM2)	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSS
TNF31(TNF2 HUM1)	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF32(TNF2 HUM2)	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTLVTVSS
TNF33(TNF3 HUM1)	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTLVTVSS
ALB6(ALB1 HUM1)	100	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB7(ALB1 HUM2)	101	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB8(ALB1 HUM3)	102	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB9(ALB1 HUM4)	103	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB10(ALB1 HUM5)	104	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSGQGTLVTVSS

Tabla 36

Nanobody™	Tiempo de inducción	Rendimiento
TNF29	ON/28C	2.1 mg/L
TNF30	ON/28C	2.7 mg/L
TNF31	ON/28C	2 mg/L
TNF32	ON/28C	1.5 mg/L
TNF33	ON/28C	0.5 mg/L

Tabla 37

ensayo: *L929s + Act D (5000c/w)*

TNF: : *TNFa* humano *@ 0.5ng/ml*

	EC_{50} en nM			potencia relativa	
V_{HH}	media	desv.est	#	media	desv.est
TNF1	**0.707**	**0.265**	**14**	**0.015**	**0.007**
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
TNF29	1.336		1	0.013	
TNF30	0.985		1	0.017	
TNF2	**1.412**	**0.622**	**14**	**0.007**	**0.002**
TNF15	5.896	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	2.422	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	7.555	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	3.134	0.481	4	0.004	0.001
TNF19	7.372	0.941	4	0.001	0.001
TNF31	2.195		1	0.008	
TNF32	2.506		1	0.007	
TNF3	**0.224**	**0.133**	**14**	**0.048**	**0.019**
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.004	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.04	0.011
TNF33	0.3		1	0.057	
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 38

	sin tratar	TA	37C	50C	60C	70C	80C	90C
TNF29	100	100	100	100	100	96	91	89
TNF30	100	100	100	99	100	96	92	89
TNF31	100	100	100	98	91	84	56	43
TNF32	100	99	98	97	87	78	45	39
TNF33	100	98	97	97	94	91	79	49

517

Tabla 39

ensayo: *alphaKYM (10000c/w)*
TNF: *TNFa* humano *@ 1ng/ml*

Nanocuerpo	EC_{50} en nM
TNF1	2.466
TNF2	4.236
TNF3	**0.655**
TNF4	0.069
TNF5	0.008
TNF6	0.121
TNF7	0.009
TNF8	0.013
TNF9	0.020
Enbrel	0.040
Humira	0.103
Remicade	**0.100**

Resultados del Documento WO 04/41862

Nanocuerpo	SEC ID No	EC_{50} en nM
1A	1	100
3E	4	12
3G	5	20
Remicade		**0,080**

Tabla 40

M13_rev	SEC ID NO: 421	GGATAACAATTTCACACAGG
Rev_9GlySer_L108	SEC ID NO: 422	TCAGTAACCTGGATCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCAG
For_GS/corto	SEC ID NO: 423	AGGTTACTGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Rev_15BspEI_L108	SEC ID NO: 424	TCAGTAACCTTCCGGAACCGCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACAAG
For_BspEI	SEC ID NO: 425	AGGTTACTGATCCGGAGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
M13_para	SEC ID NO: 426	CACGACGTTGTAAAACGAC

Tabla 41

Cebador Inverso		Secuencia
PiRevhumNot/a40c (NotI)	SEC ID NO: 427	ATGGTGGTGTGCGGCCGCCTATTATGAGGAGACGGTGACCAGG
Cebador delantero		
Pi2for (XhoI)	SEC ID NO: 428	AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

Tabla 42

TNFα humano	EC_{50} en nM		
VHH	media	desv.est	Numero de ensayos
TNF60	0.010	0.002	6
Enbrel	0.014	0.009	33
Humira	0.141	0.074	33
Remicade	0.120	0.037	33

Tabla 43

		albúmina humana	albúmina Rhesus
TNF60	K_D (nM)	**24,4**	**24,1**
	k_{on} (1/Ms)	2,05E+05	2,09E+05
	k_{off} (1/s)	5,02E-03	5,04E-03
TNF24	K_D (nM)	**11**	Nd
	k_{on} (1/Ms)	2.26E+05	Nd
	k_{off} (1/s)	2.48E-03	Nd

518

Tabla 44

PiForLong	SEC ID NO: 429	GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Rev_30GlySer_L108	SEC ID NO: 430	TCAGTAACCTGGATCCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCGCTACCCCCGCCACCGC TGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCAG
For_GlySer	SEC ID NO: 431	AGGTTACTGAGGATCCGGCGGTGGAGGCAGCGGTGGCGGGGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
PiRevCys1hum	SEC ID NO: 432	ATGGTGGTGTGAATTCTTATTAGCAGGAGACGGTGACAAGG
PiRevCys2hum	SEC ID NO: 433	ATGGTGGTGTGAATTCTTATTAGCAACCTCCACCTGAGGAGACGGTGACAAGG
AOXIFor	SEC ID NO: 434	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
AOXIRev	SEC ID NO: 435	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Tabla 45

TNFα humano EC_{50}, nM

VHH	media	desv. est	Numero de ensayos
TNF1	0.748	0.153	27
TNF55-PEG40	0.004	0.001	8
TNF55-PEG60	0.004	0.002	6
TNF55-Bitina	0.012	0.003	5
TNF56-PEG40	0.006	0.003	57
TNF56-PEG60	0.005	0.003	7
TNF56-Biotina	0.017	0.009	13
Enbrel	0.013	0.006	71
Humira	0.127	0.058	67
Remicade	0.144	0.061	67

Tabla 46

	DS534 P4	DS592 P4	DS605 P3	KM05-179 P4
p[IC]50				
Etanercept	9.55	9.49	9.51	9.51
Accipiter	9.88	9.44	9.37	9.27
pM				
Etanercept	282	324	309	309
Accipiter	132	363	427	537

Tabla 47

	Conteo WBC total (x10^6/mL)	
Dosis por Grupo	ALX0071	Etanercept
Vehiculo CMC	0.86 ± 0.09	
0.1 µg TNFα humano	3.72 ± 0.21	
0.0625 mg/kg	3.03 ± 0.6	-
0.125 mg/kg	1.23 ± 0.3**	2.40 ± 0.39
0.25 mg/kg	1.37 ± 0.17*	2.47 ± 0.54
0.5 mg/kg	-	2.19 ± 0.10

*P<0.05, **P<0.01 contra 0.1 µg TNFα humano

Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de valorar usando no más que la experimentación de rutina, muchas equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en este documento. Tales equivalentes están propuestos para estar abarcados por las siguientes reivindicaciones.

Todas las referencias descritas en este documento, están incorporadas por referencia en su totalidad.

520

NOVEDAD DE LA INVENCIÓN

Habiéndose descrito la presente se considera como novedad, y por lo tanto, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

521

REIVINDICACIONES

1. Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4 respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), caracterizado porque:

d) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene, al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- secuencias de aminoácido que tienen solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY; y

e) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene, al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- secuencias de aminoácidos que tienen 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y

f) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácido que tiene, al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia

con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- secuencias de aminoácido que tienen solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

2. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY.

3. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.

4. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.

5. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque:

- CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN

6. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.

7. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque CDR1 comprende la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácido SPSGFN.

123

8. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque

- cualquier sustitución de aminoácido es una sustitución de aminoácido conservativa; y/o

- dicha secuencia de aminoácido solamente contiene sustituciones de aminoácido, y no supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido anterior(es).

9. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque es un Nanocuerpo humanizado.

10. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque es un Nanocuerpo clase GLEW.

11. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.

12. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque es un Nanocuerpo clase GLEW.

13. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque es un Nanocuerpo clase GLEW con un residuo de arginina (R) en la posición 103.

14. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado porque tiene al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 99% de identidad de secuencia (como se define aquí) con una de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NOS. 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) ó 96 (TNF30).

524

15. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque contiene un residuo leucina (L) en la posición 108.

16. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor de 1.10-3 (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

17. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando Células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

18. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor de 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

19. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor de 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

20. Nanocuerpo contra TNF-alfa, el cual consiste de 4 regiones de estructura (FR1 hasta FR4 respectivamente) y 3 regiones que determinan la complementariedad (CDR1 hasta CDR3 respectivamente), caracterizado porque

d) CDR1 es:

525

- la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- una secuencia de aminoácido que tiene, al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido DYWMY; o

- secuencias de aminoácido que tienen solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido DYWMY;

y en la cual:

e) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácido que tiene, al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- secuencias de aminoácidos que tienen 2 ó solamente 1 diferencia(s) de aminoácido(s) con la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG;

y en la cual

f) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácido que tiene, al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- secuencias de aminoácidos que tienen solamente 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácido SPSGFN.

21. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY.

22. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 20,

caracterizado porque CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG.

23. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

24. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque:

- CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN; o

- CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; o

- CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

25. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

26. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque CDR1 es la secuencia de aminoácido DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácido EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácido SPSGFN.

27. Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-26, caracterizado porque:

- cualquier sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservativo; y/o

- dicha secuencia de aminoácido preferiblemente solamente contiene sustituciones de aminoácido, y no supresiones o inserciones de aminoácido, comparada con la(s) secuencia(s) de aminoácido anterior(es).

28. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque es un Nanocuerpo

527

humanizado.

29. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque es un Nanocuerpo clase GLEW.

30. Un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.

31. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque es un Nanocuerpo clase GLEW con un residuo de arginina (R) en la posición 103.

32. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque tiene al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 99% de identidad de secuencia (como se define aquí) con una de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NOS. 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) ó 96 (TNF30).

33. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque contiene un residuo leucina (L) en la posición 108.

34. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque tiene una relación Koff de TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor de 1.10-3 (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

35. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor

que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

36. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor de 5nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

37. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-27, caracterizado porque tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor de 3nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

38. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 -37, caracterizado porque es elegido del grupo que consiste de TNF 13 (SEC ID NO: 76), TNF 14 (SEC ID NO: 77), TNF 29 (SEC ID NO: 95) y TNF 30 (SEC ID NO:96).

39. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-38, caracterizado porque es TNF 30 (SEC ID NO: 96).

40. Proteína o polipéptido, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39.

41. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 40, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de al menos un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39.

42. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40-41, caracterizados porque

comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39.

43. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40-42, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39, y el cual es tal que dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la señal de transducción que es mediada por tal reticulación del receptor.

44. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40-42, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39, y el cual es capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor de TNF en un trímero de TNF.

45. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42-44, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39, los cuales son directamente ligados entre sí o enlazados entre sí vía un enlazador.

46. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 45, caracterizados porque el enlazador es una secuencia de aminoácido.

47. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 46, caracterizados porque el enlazador es una secuencia de aminoácido que comprende al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente al menos 17 aminoácidos, tal como aproximadamente 20-40 aminoácidos.

530

48. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 47, caracterizados porque el enlazador comprende residuos de glicina y serina.

49. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42-48, caracterizados porque comprende o consiste esencialmente del polipéptido TNF 7 (SEC ID NO: 73), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF 1 han sido humanizados.

50. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42-49, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente del polipéptido TNF 55 (SEC ID NO: 419) o TNF 56 (SEC ID NO: 420).

51. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40-49, caracterizados porque son pegilados.

52. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40-49, caracterizados porque además comprenden al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

53. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 52, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana tiene las secuencias CDR presentes en ALB 8 (SEC ID NO: 102).

54. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 42, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39, los cuales además comprenden al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

55. Proteína o polipéptido de conformidad con la

reivindicación 54, caracterizados porque los dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39 están ya sea directamente ligados con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, o están ligados con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana vía un enlazador.

56. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 55, caracterizados porque el enlazador es una secuencia de aminoácido.

57. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 55, caracterizados porque el enlazador es una secuencia de aminoácido que comprende entre 3 y 40 residuos de aminoácidos, tal como entre 5 y 15 residuos de aminoácidos.

58. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 56 y 57, caracterizados porque el enlazador consiste de residuos de glicina y serina.

59. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 54-58, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana tiene las secuencias CDR presentes en ALB 8 (SEC ID NO: 102).

60. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-59, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es un Nanocuerpo humanizado.

61. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 60, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).

62. Proteína o polipéptido de conformidad con la

532

reivindicación 60, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102), ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).

63. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 62, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8 (SEC ID NO: 102).

64. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-63, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas de un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-39 y una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).

65. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-64, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente del polipéptido TNF24 (SEC ID NO: 90), en los cuales tanto el Nanocuerpo TNF 1, así como también el Nanocuerpo ALB 1 ha sido humanizado.

66. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-65, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de dos Nanocuerpos TNF 30 y un Nanocuerpo ALB 8.

67. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-66, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente del polipéptido TNF 60 (SEC ID NO: 417).

533

68. Nanocuerpo contra TNF-alfa, caracterizado porque es una variante humanizada de un Nanocuerpo contra TNF-alfa, en el cual el Nanocuerpo contra TNF-alfa tiene las secuencias siguientes secuencias de estructura: FR1: SEC ID NO: 130; FR2: SEC ID NO: 198; FR3: SEC ID NO: 266; y FR4: SEC ID NO: 334.

69. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque tiene las CDR que son tales que el Nanocuerpo tiene una relación Koff de TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor de 1.10-3 (1/s).

70. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 68 o 69, caracterizado porque tiene CDRs que son tales que el Nanocuerpo tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; y en particular mejor de 12nM, más en particular mejor de 5 nM, aún más en particular mejor de 3nM.

71. Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-70, caracterizado porque es dirigido contra el mismo epítope de TNF (es decir, el trímero de TNF) como TNF1.

72. Nanocuerpo caracterizado porque es dirigido contra el mismo epítope en el trímero de TNF-alfa como el Nanocuerpo TNF1 (SEC ID NO: 52).

73. Un Nanocuerpo caracterizado porque es dirigido contra el mismo epítope en el trímero de TNF-alfa como Nanocuerpo TNF3 (SEC ID NO: 60).

74. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado porque tiene CDRs que son tales que el Nanocuerpo tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10-3 (1/s),

534

preferiblemente mejor de 1.10-3 (1/s).

75. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 73 ó reivindicación 74, caracterizado porque tiene CDRs que son tales que el Nanocuerpo tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; y en particular mejor de 12nM, más en particular mejor de 5 nM, aún más en particular mejor de 3nM.

76. Nanocuerpo, caracterizado porque es una variante humanizada del Nanocuerpo TNF1 (SEC ID NO: 52).

77. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 76, caracterizado porque tiene CDRs que son tales que el Nanocuerpo tiene una relación Koff para TNF mejor de 2.10-3 (1/s), preferiblemente mejor de 1.10-3 (1/s).

78. Nanocuerpo de conformidad con la reivindicación 76 ó reivindicaciones 77, caracterizado porque tiene CDRs que son tales que el Nanocuerpo tiene un valor EC50 en el ensayo a base de células, usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor EC50 del Nanocuerpo VHH 3 E (SEC ID NO:4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; y en particular mejor de 12nM, más en particular mejor de 5 nM, aún más en particular mejor de 3nM.

79. Proteína o polipéptido, caracterizado porque comprende o consiste esencialmente de un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-78.

80. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 79, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de al menos un Nanocuerpo de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 68-78.

81. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 79-80, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-78.

82. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 79-81, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-78, y en los cuales dicha proteína o polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la señal de transducción que es mediada por tal reticulación del receptor.

83. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 79-81, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-78, y los cuales son capaz de enlazarse intramolecularmente con al menos dos sitios de enlace al receptor de TNF en un trímero de TNF.

84. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81-83, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-78, los cuales son directamente ligados entre sí o enlazados entre sí vía un enlazador.

85. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 84, caracterizados porque el enlazador es una secuencia de aminoácido.

86. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 85, caracterizados porque el enlazador es una

secuencia de aminoácido que comprende al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente al menos 17 aminoácidos, tal como aproximadamente 20-40 aminoácidos.

87. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 86, caracterizados porque el enlazador comprende residuos de glicina y serina.

88. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81-83, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente del polipéptido TNF 7 (SEC ID NO: 73), en los cuales ambos Nanocuerpos TNF 1 han sido humanizados.

89. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 80-88, caracterizados porque son pegilado.

90. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 80, caracterizados porque comprenden dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-78, y en los cuales la proteína o polipéptido además comprenden al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana.

91. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 90, caracterizados porque los dos Nanocuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 68-78 están ya sea directamente ligados con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana, o están ligados con al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana vía un enlazador.

92. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 91, caracterizados porque el enlazador es una

secuencia de aminoácido.

93. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 92, caracterizados porque el enlazador es una secuencia de aminoácido que comprenden entre 3 y 40 residuos de aminoácidos, tal como entre 5 y 15 residuos de aminoácidos.

94. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 92 ó 93, caracterizados porque el enlazador consiste de residuos de glicina y serina.

95. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 90-94, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana tiene las secuencias CDR presentes en ALB 8 (SEC ID NO: 102).

96. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 90-95, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es un Nanocuerpo humanizado.

97. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 96, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).

98. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 97, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina de suero humana es elegido del grupo que consiste de ALB 3 (SEC ID NO: 87), ALB 4 (SEC ID NO: 88), ALB 5 (SEC ID NO: 89), ALB 6 (SEC ID NO: 100), ALB 7 (SEC ID NO: 101), ALB 8 (SEC ID NO: 102), ALB 9 (SEC ID NO: 103) y ALB 10 (SEC ID NO: 104).

99. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 98, caracterizados porque al menos un Nanocuerpo

dirigido contra albúmina de suero humana es ALB 8 (SEC ID NO: 102).

100. Proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81-99, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de dos Nanocuerpos los cuales son variantes humanizadas de un Nanocuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 65-67 y una variante humanizada del Nanocuerpo ALB 1 (SEC ID NO: 63).

101. Una proteína o polipéptido, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de dos o más dominios variables de immunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que son cada uno dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (y en particular, del trímero de TNF-alfa) que caen en, y/o forman parte del(los) sitio(s) de enlace al receptor del trímero de TNF, de manera tal que dicho polipéptido, después del enlace a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que es mediada por dicho trímero de TNF y/o la señal de transducción que es mediada por tal reticulación del receptor.

102. Una proteína o polipéptido, caracterizados porque comprenden o consisten esencialmente de dos o más dominios variables de immunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que son cada uno dirigidos contra epítopes en TNF-alfa (y en particular del trímero TNF-alfa) que cae en y/o forma parte del sitio(s) de enlace al receptor del trímero de TNF, de manera tal que dicho polipéptido es capaz del enlace intramolecular con al menos dos sitios de enlace al receptor de TNF en un trímero de TNF.

103. Proteína o polipéptido de conformidad con la

reivindicación 101 ó 102, caracterizados porque los dos dominios variables de inmunoglobulina son dirigidos contra el mismo epítope como Nanocuerpo TNF1 (SEC ID NO: 52).

104. Proteína o polipéptido de conformidad con la reivindicación 101 ó 102, caracterizados porque los dos o más dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos.

105. Secuencia de nucleótido o ácido nucleico, caracterizada porque codifica un Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

106. Célula hospedera, caracterizada porque comprende una secuencia de nucleótido o ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 105, o la cual expresa o es capaz de expresar un Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-104.

107. Método para preparar un Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-102, caracterizado porque comprende cultivar o mantener una célula hospedera de conformidad con la reivindicación 106, bajo condiciones tal que dicha célula hospedera produce o expresa un Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-104; y la cual además comprende, aislar el Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-104.

108. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende al menos, un Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-104, y opcionalmente, al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

109. Una formulación farmacéutica de conformidad con la

reivindicación 108, o un Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-104, caracterizada porque es para el tratamiento de al menos, un trastorno o enfermedad elegido del grupo que consiste de inflamación, artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotitis autoinmune, diabetes tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

110. Uso de un Nanocuerpo, proteína o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-104, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de al menos, una enfermedad o trastorno elegido del grupo que consiste de inflamación, artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotitis autoinmune, diabetes tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

111. Proteína o polipéptido, caracterizado porque tiene

al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 99% de identidad de secuencia (como se define aquí) con el polipéptido de TNF 60 (SEC ID NO: 417).

542

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a Nanobodies™ (Nanocuerpos) mejorados contra el factor-alfa de necrosis del tumor (TNF-alfa), así como también a polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente de uno o más de tales Nanocuerpos. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales Nanocuerpos y polipéptidos; a métodos para preparar tales Nanocuerpos y polipéptidos; a células hospederas que expresan o son capaces de expresar tales Nanocuerpos o polipéptidos; a composiciones que comprenden tales Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos o células hospederas; y a usos de tales Nanocuerpos, tales polipéptidos, tales ácidos nucleicos, tales células hospederas o tales composiciones, en particular, para propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, tales como los propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Ablynx N.V.

<120> Nanobodies™ (Nanocuerpos) mejorados contra el Factor-alfa del Factor Necrosis del Tumor

<130> ABL-027-PCT

<140> PCT/EP2006/004678
<141> 2006-05-17

<150> 60/682,332
<151> 2005-05-18

<160> 476

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (11)..(11)
<223> Residuo Hallmark

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Xaa Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Residuo Hallmark

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (9)..(10)
<223> Residuo Hallmark

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (12)..(12)
<223> Residuo Hallmark

<400> 2

Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val Ala
1 5 10

<210> 3
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (21)..(22)
<223> Residuo Hallmark

<400> 3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(2)
<223> Residuo Hallmark

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (6)..(6)
<223> Residuo Hallmark

<400> 4
Xaa Xaa Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2
<400> 6

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 7

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 8

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 9

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 10

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 11

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 12

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento FR4

<400> 13

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 15

Asp Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 16

Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly
1 5 10

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 17

Asn Tyr Tyr Met Gly
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 18

Val Ser Trp Met Tyr
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 19

Ala His Ser Val Tyr Thr Met Gly
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 20

Gly Tyr Tyr Met Gly
1 5

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 21

Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 22

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 23

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Elemento CDR2

<400> 24

Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2
<400> 25

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2
<400> 26

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 27

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 28

Ser Ile Ser Trp Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Lys Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 29

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 30

Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 31

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ala Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 32

Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn
1 5 10

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 33

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 34

Ser Pro Ser Gly Phe Asn
1 5

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 35

Ser Pro Ser Gly Ser Phe
1 5

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 36

Ser Phe Gly Met Ser
1 5
<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 37

Leu Asn Leu Met Gly
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 38

Ile Asn Leu Leu Gly
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 39

Asn Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 40

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 41

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 42

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 43

Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 44

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 45

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 46

Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 47

Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 48

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 49

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 50

Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser
1 5

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 51

Gly Arg Gly Ser Pro
1 5

<210> 52
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 53

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly Val Ser
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Ser Phe Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asp Phe Ser Val Ser
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Ile Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Ser Phe Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 56
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 56
Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Glu Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 57
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 57

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Glu Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 58
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 58

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ala His
20 25 30

Ser Val Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
35 40 45

Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Cys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu
100 105 110

Ala Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 59
<211> 123

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 59

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gln Leu Leu
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Trp Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Lys Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo
<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 61

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp Leu Asn
20 25 30

Leu Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Cys Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu His Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Lys Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Glu Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Trp Asp Ile Asn
20 25 30

Leu Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys
85 90 95

Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 63

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 64
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 64

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Gly Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 65

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 66
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 66

Gln Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 67
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 67
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Ile
35 40 45

Ser Arg Asp Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Lys Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr
100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> enlazador

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 69
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 70
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn
165 170 175

Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro
210 215 220

Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 71
<211> 267
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 71

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr
165 170 175

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
180 185 190

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
195 200 205

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu
210 215 220

Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 72
<211> 255
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser
145 150 155 160

Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
165 170 175

Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr
180 185 190

Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys
195 200 205

Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly
225 230 235 240

Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

<210> 73
<211> 260
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 73
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val
245 250 255

Thr Val Ser Ser
260

<210> 74
<211> 288
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser
180 185 190

Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
195 200 205

Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr
210 215 220

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys
225 230 235 240

Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
245 250 255

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val
260 265 270

Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 75
<211> 276
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser
165 170 175

Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln
180 185 190

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly
195 200 205

Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys
225 230 235 240

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu
245 250 255

Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
260 265 270

Thr Val Ser Ser
275

<210> 76
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 79
<211> 129

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 79

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 80
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 81
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 81

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 82
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 83
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 83
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 84
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 85
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 86

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo
<400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo
<400> 89

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 363
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
210 215 220

Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
260 265 270

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
275 280 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
290 295 300

Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
305 310 315 320

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
325 330 335

Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
340 345 350

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
355 360

<210> 91
<211> 391
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 91

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr
165 170 175

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
180 185 190

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
195 200 205

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu
210 215 220

Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
275 280 285

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
290 295 300

Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
305 310 315 320

Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
325 330 335

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
340 345 350

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
355 360 365

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
370 375 380

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
385 390

<210> 92
<211> 379
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 92

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145 150 155 160

Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
165 170 175

Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
180 185 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
195 200 205

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
260 265 270

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
275 280 285

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
290 295 300

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
340 345 350

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 93
<211> 384
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 93

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val
245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
340 345 350

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
355 360 365

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 94
<211> 400
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 94

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser
165 170 175

Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln
180 185 190

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly
195 200 205

Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys
225 230 235 240

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu
245 250 255

Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
260 265 270

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
275 280 285

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
290 295 300

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser
305 310 315 320

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile
325 330 335

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
340 345 350

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
355 360 365

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
370 375 380

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
385 390 395 400

<210> 95
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 96
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 97
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 97

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 98
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 98

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
65 70 75 80

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 99
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 100

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 101
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 101

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 102
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 102

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 103
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 103

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 104
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo
<400> 104

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 130
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gln Ile Ile Phe Gly Ser His
20 25 30

Val Ala Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Pro Ser Gly Asp Phe Gly Pro Glu Gly Glu Phe Glu
50 55 60

His Val Thr Ala Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ala Lys Asn Ser
65 70 75 80

Val Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Pro Tyr Arg Gly Gly Arg Asp
100 105 110

Tyr Arg Trp Glu Tyr Glu Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
115 120 125

Thr Val
130

<210> 106

<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 106

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn Ala Tyr
20 25 30

Ala Thr Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Gln Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
115 120

<210> 107
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 107

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gln Leu Phe Ser Thr Asn
20 25 30

Asp Val Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Asp Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Asp Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Val Ile Ser Arg Glu Gly Glu Met Val Tyr Leu Glu Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ile Asn
85 90 95

Arg Leu Arg Ser Thr Trp Gly Ile Arg Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr
20 25 30

Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Phe Glu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr
100 105 110

Val Ala Ser
115

<210> 109
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Thr Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser Ser Val
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Leu
35 40 45

Ala Gly Val Gly Tyr Asp Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ala Arg Gly Asn Arg Glu Ser Thr Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Glu Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Ala Glu Pro Ile Gly Ala Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(4)
<223> resiudos de aminoácidos desconocidos, probablemente EVQL, QVQL o una secuencia similar

<400> 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Ala Asp Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Thr Pro Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Ser Tyr Ser Asn Gly Asn Pro His Arg Phe Ser Gln Tyr Gln
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (77)..(77)
<223> Residuo de aminoácido desconocido

<400> 111

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Gly Gly Gly Ser Ile Val Tyr Ala Glu Ser Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Xaa Thr Met Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Asn Asn Ile Ala Thr Leu Arg Gln Gly Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> nanocuerpo

<400> 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Asn Phe Val Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Trp Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ser Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Arg Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Val Val Gln Val Ile Asp Pro Ser Trp Ser Gly Val Asn Leu Asp
100 105 110

Asp Tyr Asp Tyr Leu Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 113
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 113

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn Ala Tyr
20 25 30

Ala Thr Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Gln Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Thr Ile Ser Ser Ile Val
20 25 30

Met Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Ile Gly Ser Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Val Pro Pro Arg Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 115
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 115

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Arg Ala
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Arg Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Val Pro Arg Tyr Glu Asn Gln Trp Ser Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 116

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asp Ser Gly Gly Gly Ser Pro Met Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Phe Ser Thr Gly Ala Asp Gly Gly Ser Trp Tyr Trp Ser Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Ser Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 117
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Glu Arg Ser Ser Asn Arg Tyr
20 25 30

Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu
35 40 45

Ala Arg Val Asp Val Ser Gly Gly Asn Thr Leu Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Val Ser Arg Ile Asn Gly Lys Asn Ala Met Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Gly Trp Gly Thr Thr Gln Tyr Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 118
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 118

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr Phe Ser
20 25 30

Ala Tyr Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu
35 40 45

Trp Val Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Asn Gly Arg Phe Lys Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Gln Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Arg Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 119
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Arg Gly Phe Tyr Lys Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ser Ile Lys Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Glu Asn
65 70 75 80

Thr Val Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Ser Ser His Tyr Ser Tyr Val Tyr Ser Lys
100 105 110

Ala Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 120

<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 120

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Phe Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ala Ser
20 25 30

Ser Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Tyr Glu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Gln Gly Ile Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 121
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (119)..(119)
<223> Residuo de aminoácido desconocido

<400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Ile Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val His
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95

Ala Val Val Gln Pro Tyr Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Glu
100 105 110

Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 122
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Thr
20 25 30

Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Asp Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Arg Gly Ile Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 123
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 123

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Asp Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Ile Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Ser Ser Asn Arg Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Arg Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ala Ala Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Ser Ser Asn Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr Phe Ser
20 25 30

Ala Tyr Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu
35 40 45

Phe Val Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asn
50 55 60

Ser Val Asn Gly Arg Phe Lys Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Gln Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Arg Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 125
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 125

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Gln Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo
<400> 126

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr
20 25 30

Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Phe Glu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 127

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ala Ser Gly Val Lys Val Asn
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Asp Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Leu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Arg Thr Tyr Trp Ala His Leu Pro Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 128
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 128

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Gly Ser Val
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Gly Tyr Asp Gly Asn Ser Ile Arg Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Met Glu Asn Leu Asn Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Leu Cys
85 90 95

Ala Ala Glu Pro Leu Ala Arg Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 129
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> nanocuerpo

<400> 129

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Thr Arg Thr Asn Asp Arg Phe
20 25 30

Asn Met Ala Trp Phe His Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asp Val Ala Gly Tyr Asn Thr Ala Tyr Gly Asp Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Glu Asn Thr Val Val
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Gly Trp Gly Ile Ser Gln Ser Asp Tyr Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 130
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 130

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 131
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 131

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly
20 25 30

<210> 132
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento FR1

<400> 132

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asp Phe Ser
20 25 30

<210> 133
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 133

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 134
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 134

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 135
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 135

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 136
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 136

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 137
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 137

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Thr
20 25 30

<210> 138
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 138

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 139
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 139

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gln Ile Ile Phe Gly
20 25 30

<210> 140
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 140

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn
20 25 30

<210> 141
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 141

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gln Leu Phe Ser
20 25 30

<210> 142
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 142

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 143
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Elemento FR1

<400> 143
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Thr Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 144
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(4)
<223> Resiudos de aminoácidos desconocidos, probablemente EVQL, QVQL o una secuencia similar

<400> 144

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Ser
20 25 30

<210> 145
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 145

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
20 25 30

<210> 146
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 146

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Asn Phe Val
20 25 30

<210> 147
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 147

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn
20 25 30

<210> 148
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 148

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Thr Ile Ser Ser
20 25 30

<210> 149
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 149

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser
20 25 30

<210> 150
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 150

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 151
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 151

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Glu Arg Ser Ser Asn
20 25 30

<210> 152
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento FR1

<400> 152

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr
20 25 30

<210> 153
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 153

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Arg Gly Phe Tyr
20 25 30

<210> 154
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 154
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Phe Ser Gly Phe Ala Phe Ser
20 25 30

<210> 155
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 155

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 156
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 156

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 157
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 157

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser
20 25 30

<210> 158
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 158

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr
20 25 30

<210> 159
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 159

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser
20 25 30

<210> 160
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 161
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 161

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ala Ser Gly Val Lys
20 25 30

<210> 162
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 162

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Gly
20 25 30

<210> 163
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 163

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Thr Arg Thr Asn
20 25

<210> 164
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 164

Asp Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 165
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 165

Val Ser Trp Met Tyr
1 5

<210> 166
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 166

Val Ser Trp Met Tyr
1 5

<210> 167
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 167

Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly
1 5 10

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 168

Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly
1 5 10

<210> 169
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 169

Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly
1 5 10

<210> 170
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 170

Ala His Ser Val Tyr Thr Met Gly
1 5

<210> 171
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 171

Gly Tyr Tyr Met Gly
1 5

<210> 172
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 172

Asn Tyr Tyr Met Gly
1 5

<210> 173
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 173

Ser His Val Ala Ala
1 5

<210> 174
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 174

Ala Tyr Ala Thr Gly
1 5

<210> 175
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 175

Thr Asn Asp Val Gly
1 5

<210> 176
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 176

Thr Thr Ser Met Thr
1 5

<210> 177
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 177

Ser Val Ala Met Gly
1 5

<210> 178
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 178

Asp Ser Ala Met Gly
1 5

<210> 179
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 179

Thr Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 180
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 180

Thr Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 181
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 181

Ala Tyr Ala Thr Gly
1 5

<210> 182
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 182

Ile Val Met Leu Gly
1 5

<210> 183
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 183

Ser Tyr Asp Met Gly
1 5

<210> 184
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 184

Thr Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 185
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 185

Arg Tyr Asn Met Ala
1 5

<210> 186

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 186

Phe Ser Ala Tyr Ser Met Thr
1 5

<210> 187
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 187

Lys Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 188
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 188

Ala Ser Ser Met Ala
1 5

<210> 189
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 189

Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 190
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 190

Ala Thr Ser Met Thr
1 5

<210> 191
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 191
Asn Tyr Asp Val Gly
1 5

<210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 192

Phe Ser Ala Tyr Ser Met Thr
1 5

<210> 193
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 193

Thr Ala Asp Met Gly
1 5

<210> 194
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 194

Thr Thr Ser Met Thr
1 5

<210> 195
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 195

Val Asn Asp Met Gly
1 5

<210> 196
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 196

Ser Val Ala Met Gly
1 5

<210> 197
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 197

Asp Arg Phe Asn Met Ala
1 5
<210> 198
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 198

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 199
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2
<400> 199

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 200
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 200

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 201
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 201

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 202
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 202

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 203
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 203

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 204
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 204

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 205
<211> 14
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 205

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gln Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 206
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 206

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 207
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento FR2

<400> 207

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 208
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 208

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 209
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 209

Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 210

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 210

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Phe Glu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 211
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 211

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 212
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 212

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 213
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 213

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 214
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 214

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 215
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 215

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 216
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 216

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 217
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 217

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 218
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 218

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 219
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 219

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 220
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 220

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 221
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 221

Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 222
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 222

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Tyr Glu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 223
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 223

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 224
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 224

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 225
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 225

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Ile Val Ala
1 5 10

<210> 226
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 226

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu Phe Val Ser
1 5 10

<210> 227
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 227

Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 228
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 228

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Phe Glu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 229
<211> 14

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 229

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 230
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 230

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 231
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 231

Trp Phe His Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val Ser
1 5 10

<210> 232
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 232

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 233
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 233

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 234
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 234

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 235
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 235

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 236
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 236

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 237
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 237

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 238
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 238

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 239
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 239

Ser Ile Ser Trp Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Lys Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 240
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 240

Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 241
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 241

Glu Ile Arg Pro Ser Gly Asp Phe Gly Pro Glu Gly Glu Phe Glu His
1 5 10 15

Val Thr Ala Ser Leu Lys Gly
20

<210> 242
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 242

Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 243
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 243

Thr Ile Thr Asp Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Asp Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 244
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 244

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 245
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 245

Gly Val Gly Tyr Asp Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ala Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 246
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 246

Thr Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Ala Asp Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 247
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 247

Ala Ile Ser Trp Gly Gly Gly Ser Ile Val Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 248
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 248

Ser Ile Ser Trp Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ser Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 249
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 249

Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 250

<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 250

Ser Ile Thr Ile Gly Ser Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 251
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 251

Arg Ile Ser Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Arg Ala Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 252
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 252

Gly Ile Asp Ser Gly Gly Gly Ser Pro Met Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 253
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 253

Arg Val Asp Val Ser Gly Gly Asn Thr Leu Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 254
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 254

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Asn
1 5 10 15

Gly

<210> 255
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 255

Ser Ile Lys Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 256
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 256

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 257
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 257

Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Ile Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 258
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 258

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 259
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 259

Arg Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Ser Ser Asn Arg Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 260
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 260

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asn Ser Val Asn
1 5 10 15

Gly

<210> 261
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 261

Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 262
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 262

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 263
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 263

Thr Ile Thr Asp Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 264
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 264

Ala Ile Gly Tyr Asp Gly Asn Ser Ile Arg Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 265
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 265

Arg Ile Asp Val Ala Gly Tyr Asn Thr Ala Tyr Gly Asp Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 266
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 266

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 267
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 267

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 268
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 268

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Ile Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 269
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 269

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 270
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 270

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 271
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 271

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 272
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 272

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu
1 5 10 15

Met Asn Cys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 273
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 273

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 274
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 274

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 275
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 275

Arg Phe Thr Ile Ala Lys Asn Ser Val Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 276
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 276

Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
1 5 10 15

Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25 30

<210> 277
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 277

Arg Phe Val Ile Ser Arg Glu Gly Glu Met Val Tyr Leu Glu Met Asn
1 5 10 15

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ile
20 25 30

<210> 278
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Elemento FR3

<400> 278

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg
20 25 30

<210> 279
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 279

Arg Phe Thr Ile Ala Arg Gly Asn Arg Glu Ser Thr Val Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met Glu Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Ala
20 25 30

<210> 280
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 280

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Gly Leu Thr Pro Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gly
20 25 30

<210> 281
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (11)..(11)
<223> residuo de aminoácido desconocido

<400> 281

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Xaa Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 282
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 282

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val
20 25 30

<210> 283
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 283

Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
1 5 10 15

Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25 30

<210> 284
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 284

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 285
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 285

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Arg Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Val
20 25 30

<210> 286
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 286

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 287
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 287

Arg Phe Thr Val Ser Arg Ile Asn Gly Lys Asn Ala Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 288
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 288

Arg Phe Lys Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Arg
20 25 30

<210> 289
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 289

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Glu Asn Thr Val
1 5 10 15

Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr
20 25 30

Cys Ala Ala
35

<210> 290
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 290

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg
20 25 30

<210> 291
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento FR3

<400> 291

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val His Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys Ala Val
20 25 30

<210> 292
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 292

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Asp Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg
20 25 30

<210> 293
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 293

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Arg Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Ala
20 25 30

<210> 294
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 294

Arg Phe Lys Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Arg
20 25 30

<210> 295
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 295

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Gln Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Ser
20 25 30

<210> 296
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 296

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg
20 25 30

<210> 297
<211> 32

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 297

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Leu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 298
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 298

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Asn Thr Met Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Met Glu Asn Leu Asn Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Leu Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 299
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 299

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Glu Asn Thr Val Val Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 300
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 300

Ser Pro Ser Gly Phe Asn
1 5

<210> 301
<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 301

Ser Pro Ser Gly Ser Phe
1 5

<210> 302
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 302

Ser Pro Ser Gly Ser Phe
1 5

<210> 303
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 303

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 304
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 304

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 305
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 305

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 306
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 306

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ala Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 307
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 307

Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn
1 5 10

<210> 308
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 308

Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 309
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 309

Ala Pro Tyr Arg Gly Gly Arg Asp Tyr Arg Trp Glu Tyr Glu Tyr Glu
1 5 10 15

Tyr

<210> 310
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 310

Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Tyr
1 5 10 15

<210> 311
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 311

Asn Arg Leu Arg Ser Thr Trp Gly Ile Arg Tyr Asp Val
1 5 10

<210> 312
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 312

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

<210> 313
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 313

Glu Pro Ile Gly Ala Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr
1 5 10

<210> 314
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 314

Ser Tyr Ser Asn Gly Asn Pro His Arg Phe Ser Gln Tyr Gln Tyr
1 5 10 15

<210> 315
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 315

Ala Asn Asn Ile Ala Thr Leu Arg Gln Gly Ser
1 5 10

<210> 316
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 316

Val Gln Val Ile Asp Pro Ser Trp Ser Gly Val Asn Leu Asp Asp Tyr
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 317
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 317

Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Tyr
1 5 10 15

<210> 318
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 318

Val Pro Pro Arg Asp Asp Tyr
1 5

<210> 319
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 319

Pro Arg Tyr Glu Asn Gln Trp Ser Ser Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 320
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 320

Phe Ser Thr Gly Ala Asp Gly Gly Ser Trp Tyr Trp Ser Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Ser

<210> 321
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 321

Gly Gly Trp Gly Thr Thr Gln Tyr Asp Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 322
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 322

Arg Gly Tyr Ala Leu Asp
1 5

<210> 323
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 323

Asp Ser Ser His Tyr Ser Tyr Val Tyr Ser Lys Ala Tyr Glu Tyr Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 324
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Elemento CDR3

<400> 324

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

<210> 325
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 325

Val Gln Pro Tyr Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Glu Glu Tyr
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 326
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 326

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

<210> 327
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 327

Ala Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Ser Ser Asn Asp Tyr
1 5 10

<210> 328
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 328

Arg Gly Tyr Ala Leu Asp
1 5

<210> 329

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 329

Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 330
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 330

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

<210> 331
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 331

Arg Thr Tyr Trp Ala His Leu Pro Thr Tyr
1 5 10

<210> 332
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 332

Glu Pro Leu Ala Arg Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr
1 5 10

<210> 333
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 333

Gly Gly Trp Gly Ile Ser Gln Ser Asp Tyr Asp Leu
1 5 10

<210> 334
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 334

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 335
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 335

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 336
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 336

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 337
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 337

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 338
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 338

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 339
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 339

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 340
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 340

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 341
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 341

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 342
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 342

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 343
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 343

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 344
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 344

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 345
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 345

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 346
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 346

Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr Val Ala Ser
1 5 10

<210> 347
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 347

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 348
<211> 11

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 348

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 349
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 349

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 350
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 350

Leu Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 351
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 351

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 352
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 352

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 353
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 353

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 354
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 354

Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 355
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 355

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 356
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 356

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 357
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 357

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 358
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 358

Arg Ser Gln Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 359
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (3)..(3)
<223> Residuo de aminoácido desconocido

<400> 359

Trp Gly Xaa Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 360
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 360

Arg Ser Arg Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 361
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 361

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 362
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 362

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 363
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 363

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 364
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 364

Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 365
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Elemento FR4

<400> 365

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 366
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 366

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 367
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 367

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 368
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 368

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp
20 25 30

<210> 369
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 369

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Glu Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Trp Asp
20 25 30

<210> 370
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 370

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg
20 25 30

<210> 371
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 371

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Gly
20 25 30

<210> 372
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 372

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg
20 25 30

<210> 373
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 373

Gln Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly
20 25 30

<210> 374
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR1

<400> 374

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 375
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 375

Leu Asn Leu Met Gly
1 5

<210> 376
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 376

Ile Asn Leu Leu Gly
1 5

<210> 377
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 377

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 378
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 378

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 379
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 379

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 380
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 380

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 381
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR1

<400> 381

Asn Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 382
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 382

Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 383
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 383

Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 384
<211> 14

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 384

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 385
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 385

Trp Val Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 386
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 386

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 387
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 387

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 388
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR2

<400> 388

Trp Val Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Ile Ser
1 5 10

<210> 389
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 389

Thr Cys Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 390
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 390

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 391
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 391

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 392
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 392

Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 393
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 393

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 394
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 394

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 395
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR2

<400> 395

Arg Asp Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 396
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 396

Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr Leu His
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile
20 25 30

<210> 397
<211> 32
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 397

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile
20 25 30

<210> 398
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 398

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
20 25 30

<210> 399
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 399

Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Tyr Cys Thr Ile
20 25 30

<210> 400
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 400

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ile
20 25 30

<210> 401

<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 401

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ile
20 25 30

<210> 402
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR3

<400> 402

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 403
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 403

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
1 5

<210> 404
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 404

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
1 5

<210> 405
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 405

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 406
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 406

Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser
1 5

<210> 407
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 407

Gly Arg Gly Ser Pro
1 5

<210> 408
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 408

Gly Arg Gly Ser Pro
1 5

<210> 409
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 409

Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 410
<211> 11

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 410

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 411
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 411

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 412
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 412

Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 413
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 413

Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 414
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 414

Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 415
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 415

Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 416
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento FR4

<400> 416

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 417
<211> 363
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 417

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
210 215 220

Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
260 265 270

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
275 280 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
290 295 300

Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
305 310 315 320

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
325 330 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
340 345 350

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
355 360

<210> 418
<211> 379
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 418

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145 150 155 160

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
180 185 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
195 200 205

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
275 280 285

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
290 295 300

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
340 345 350

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 419
<211> 260
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 419

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val
245 250 255

Thr Val Ser Cys
260

<210> 420
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 420

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val
245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Cys
260

<210> 421
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 421
ggataacaat ttcacacagg 20

<210> 422
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 422
tcagtaacct ggatccgcca ccgctgcctc caccgcctga ggagacggtg accag 55

<210> 423
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 423
aggttactga ggatccgagg tgcagctggt ggagtctgg 39

<210> 424
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 424
tcagtaacct tccggaaccg ccaccgcctg aggagacggt gacaag 46

<210> 425
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 425
aggttactga tccggaggcg gtagcgaggt gcagctggtg gagtctgg 48

<210> 426
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 426
cacgacgttg taaaacgac 19

<210> 427
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 427
atggtggtgt gcggccgcct attatgagga gacggtgacc agg 43

<210> 428
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 428
aggggtatct ctcgagaaaa gagaggtgca gctggtggag tctgg 45

<210> 429
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 429
gctaaagaag aaggggtatc tctcgagaaa agagaggtgc agctggtgga gtctgg 56

<210> 430
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 430
tcagtaacct ggatcccccg ccaccgctgc ctccaccgcc gctacccccg ccaccgctgc 60

ctccaccgcc tgaggagacg gtgacaag 88

<210> 431
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 431
aggttactga ggatccggcg gtggaggcag cggtggcggg ggtagcgagg tgcagctggt 60

ggagtctgg 69

<210> 432
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 432
atggtggtgt gaattcttat tagcaggaga cggtgacaag g 41

<210> 433
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 433
atggtggtgt gaattcttat tagcaacctc cacctgagga gacggtgaca agg 53

<210> 434
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 434
gactggttcc aattgacaag c 21

<210> 435
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 435
gcaaatggca ttctgacatc c 21

<210> 436
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Elemento CDR3

<400> 436

Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 437
<211> 4
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 437

Lys Glu Arg Glu
1

<210> 438
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 438

Lys Gln Arg Glu
1

<210> 439
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 439

Gly Leu Glu Trp
1

<210> 440
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 440

Lys Glu Arg Glu Leu
1 5

<210> 441
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 441

Lys Glu Arg Glu Phe
1 5

<210> 442
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 442

Lys Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 443
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 443

Lys Gln Arg Glu Phe
1 5

<210> 444
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 444

Lys Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 445
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 445

Thr Glu Arg Glu
1

<210> 446
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 446

Thr Glu Arg Glu Leu
1 5

<210> 447
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 447

Lys Glu Cys Glu
1

<210> 448
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 448

Lys Glu Cys Glu Leu
1 5

<210> 449
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 449

Lys Glu Cys Glu Arg
1 5

<210> 450
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 450

Arg Glu Arg Glu
1

<210> 451
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 451

Arg Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 452
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 452

Gln Glu Arg Glu
1

<210> 453
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 453

Gln Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 454
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 454

Lys Gly Arg Glu
1

<210> 455
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 455

Lys Gly Arg Glu Gly
1 5

<210> 456
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 456

Lys Asp Arg Glu
1

<210> 457
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 457

Lys Asp Arg Glu Val
1 5
<210> 458
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 458

Asp Glu Cys Lys Leu
1 5

<210> 459
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 459

Asn Val Cys Glu Leu
1 5

<210> 460
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 460

Gly Val Glu Trp
1

<210> 461
<211> 4
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 461

Glu Pro Glu Trp
1

<210> 462
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 462

Gly Leu Glu Arg
1

<210> 463
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 463

Asp Gln Glu Trp
1

<210> 464
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 464

Asp Leu Glu Trp
1

<210> 465
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 465

Gly Ile Glu Trp
1

<210> 466
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 466

Glu Leu Glu Trp
1

<210> 467
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 467

Gly Pro Glu Trp
1

<210> 468
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 468

Glu Trp Leu Pro
1

<210> 469
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 469

Gly Pro Glu Arg
1

<210> 470
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento de nanocuerpo

<400> 470

Gly Leu Glu Arg
1

<210> 471
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> espaciador

<400> 471

Gly Gly Gly Cys
1

<210> 472
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de inmunoglobulina

<400> 472

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 473
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de inmunoglobulina

<400> 473

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 474
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de inmunoglobulina

<400> 474

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 475
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> constructo de inmunoglobulina

<400> 475

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His
20 25 30

Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 476
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador

<400> 476

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
1 5 10 15

Ala

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 123
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-121403- -00004-0000

Fecha: 2010-03-03 16:42:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 689

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	305863	05/01/2010	$7,486,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005 01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	*** N.CREACION CORRECCION A SOLICITUD	114,000.00
		TOTAL : $	114,000.00

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

No: 16204-841-001-1.