

AGLUTINANTES DE TNF MEJORADOS

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a secuencias de aminoácidos,
5 compuestos y polipéptidos que se unen al factor de necrosis
tumoral alfa ("TNF" o "TNF-alfa"). En particular, la presente
invención se refiere a dominios variables únicos de
inmunoglobulina de cadena pesada mejorados (también
denominados aquí como "ISV" o "ISVD") que se unen al factor
10 de necrosis tumoral alfa, así como a proteínas, polipéptidos
y otros constructos, compuestos, moléculas o entidades
químicas que comprenden tales ISVD, colectivamente
aglutinantes de TNF. Otros aspectos, realizaciones,
características, usos y ventajas de la invención serán claros
15 para el experto en la materia con base en la descripción en
este documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la presente solicitud, los residuos/ posiciones de
aminoácidos en una Dominio variable de inmunoglobulina de
20 cadena pesada se indicarán con la numeración según Kabat. En
aras de la conveniencia, la Figura 1 proporciona una tabla
que enumera algunas de las posiciones de aminoácidos que se
mencionarán específicamente en este documento y su numeración
según algunos sistemas de numeración alternativos (como Aho e

IMGT. Nota: a menos que se indique explícitamente lo contrario, para la presente descripción y reivindicaciones, la numeración de Kabat es decisiva, otros sistemas de numeración se dan únicamente como referencia).

5 Con respecto a las CDR, como es bien sabido en la técnica, existen múltiples convenciones para definir y describir las CDR de un fragmento VH o VHH, tales como la definición de Kabat (que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más comúnmente utilizada) y la definición
10 de Chothia (que se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural). La referencia se hace, por ejemplo, en el sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>. Para los propósitos de la presente descripción y reivindicaciones, aunque también se pueden mencionar las CDR según Kabat, las CDR se definen
15 más preferiblemente sobre la base de la definición AbM (que se basa en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular), ya que se considera una mezcla óptima entre las definiciones de Kabat y Chothia. Se hace referencia nuevamente al sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>.

20 La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son enfermedades crónicas, incapacitantes y progresivas. La mayoría de las terapias farmacológicas no biológicas, como los aminosalicilatos, esteroides e inmunomoduladores,

proporcionan una mejoría sintomática pero no detienen el proceso inflamatorio subyacente y no modifican el curso de la enfermedad. El advenimiento de los agentes anti factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF- α) (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol) ha cambiado drásticamente la forma en que se trata la EII cambiando el curso de la enfermedad (menos cirugías, menos hospitalizaciones, mejor calidad de vida, ahorro de esteroides, mayor remisión clínica y tasas de curación de la mucosa en CD y CU) y la calidad de vida y productividad del trabajo de los pacientes (véase Amiot y Peyrin-Biroulet 2015 Ther Adv Gastroenterol 8:66-82). La vía de administración más común para estas proteínas terapéuticas es la inyección. Dado que la mayoría de estas proteínas tienen una vida media corta en suero, necesitan ser administradas con frecuencia o en dosis altas para que sean efectivas. La administración sistémica se asocia además con un mayor riesgo de infecciones. En conjunto, esto da como resultado una pérdida de cumplimiento del paciente (véase Singh et al., 2008 J Pharm Sci 97:2497-2523).

Sin embargo, los indeseables efectos secundarios a largo plazo y las infecciones oportunistas, incluyendo la tuberculosis y el linfoma de Hodgkin son causados por la inmunosupresión generalizada y el resultado de inyecciones sistémicas repetidas del tratamiento con anticuerpos

monoclonales actualmente usados (Ali et al., 2013; Galloway et al., 2011; Ford & Peyrin-Biroulet, 2013; Kozuch y Hanauer, 2008; Schreiber y otros, 2007; Syed et al., 2013).

La administración oral de anticuerpos anti-TNF- α debe
5 evitar algunos de estos efectos secundarios.

Sin embargo, estos agentes anti-TNF- α son proteínas complejas. La administración oral da como resultado la degradación en el ambiente ácido y rico en proteasas del tracto gastrointestinal (GI).

10 Al utilizar proteínas señuelo para proteger el anticuerpo terapéutico, Avaxia Biologics Inc. ha llevado a cabo recientemente un estudio basado en pacientes que comprende anticuerpos colostrales bovinos policlonales para el TNF alfa humano (AVX-470) administrado por vía oral en
15 pacientes con colitis ulcerosa. Sin embargo, el estudio se suspendió.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos medicamentos contra la EII.

Los ISVD (y en particular los Nanocuerpos) que se pueden
20 unir al TNF y sus usos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, de los documentos WO 2004/041862 y WO 2006/122786, que describen Nanocuerpos contra el TNF y su uso para la prevención o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados o mediados por señalización de TNF- α o TNF- α , tales

como inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, diabetes tipo 1, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

El documento WO 2006/122786 desvelado como SEQ ID NO: 125 es un Nanocuerpo anti-TNF- α específico denominado NC55TNF_NC7 (PMP6C11). La secuencia de este Nanocuerpo de la técnica anterior se proporciona en la Tabla A a continuación, como SEQ ID NO: 58. La Tabla A también proporciona (como SEQ ID NO: 1) la secuencia de una versión optimizada de secuencia (también referida aquí como "Referencia A") de este aglutinante de TNF de la técnica anterior, junto con sus CDR (de acuerdo con las convenciones de Kabat y AbM). Como se puede ver a partir del alineamiento en la Figura 2, esta secuencia de versión optimizada contiene, en comparación como la de la Secuencia de la técnica anterior de SEQ ID NO: 58, las siguientes mutaciones: Q1E, A14P, Q27F, S29F, P40A, A49S, K73N, Q75K, V78L, D82aN, K83R y Q108L (según la numeración de

Kabat).

El documento WO 2015/1733256 se refiere a dominios de inmunoglobulina mejorados, que comprenden extensiones C-terminal que evitan la unión de los denominados anticuerpos preexistentes ("PEA"). El documento WO 2015/1733256 divulga la SEQ ID NO: 345 como un Nanocuerpo anti-TNF- α específico, que se denomina aquí también TNF345 (SEQ ID NO: 59). Como puede verse a partir del alineamiento en la Figura 2, la versión optimizada de la secuencia de Referencia A contiene, en comparación como la de la Secuencia de la técnica anterior de SEQ ID NO: 59, las siguientes mutaciones: V11L y L89V (según la numeración de Kabat).

Recientemente se ha propuesto un cóctel de fragmentos de anticuerpo VHH monoclonales de llama neutralizantes de toxina para la terapia oral potencial (Hussack et al., 2011 J Biol Chem 286, 8961-76). Sin embargo, Dumoulin et al. (2002 Protein Sci, 11, 500-15), Harmsen et al. (2006 Appl Microbiol Biotechnol, 72, 544-51) y Hussack et al. (2012 Methods Mol Biol, 911, 417-29) alegaron que los fragmentos de anticuerpo de llama de dominio único parecen ser muy susceptibles a la destrucción proteolítica dentro del sistema gastrointestinal humano.

El documento WO2007/025977 describe un tratamiento de

enterocolitis crónica, que implica la secreción in situ de Nanocuerpos anti-mTNF por bacterias *L. lactis* administradas por vía oral.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objetivo proporcionar aglutinantes de TNF mejorados, en particular compuestos y polipéptidos anti-TNF mejorados, más particularmente ISVD anti-TNF y aún más en particular Nanocuerpos anti-TNF

10 mejorados. Los aglutinantes de TNF mejorados proporcionados por la invención también se denominan aquí "aglutinantes de TNF de la invención" o "aglutinantes de TNF".

Más en particular, la presente invención pretende proporcionar aglutinantes de TNF mejorados que serían útiles

15 en el tratamiento de enfermedades del tracto digestivo tales como, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, mucositis, estomatitis aftosa, enfermedad celíaca, trauma en el tracto digestivo y cánceres en el tracto

20 digestivo. Esos aglutinantes de TNF deberían ser preferiblemente estables y susceptibles de administración oral.

Se espera que los aglutinantes de TNF administrados por vía oral no solo neutralicen el TNF en el lumen del tracto

digestivo sino que también accedan a la lámina propia y a la submucosa ya que la barrera intestinal del tracto digestivo puede romperse o verse comprometida por una inflamación o ulceración graves, incluyendo, pero no limitado a, enfermedad

5 periodontal, estomatitis aftosa, infecciones bacterianas, virales, fúngicas o parasitarias del tracto digestivo, úlceras pépticas, úlceras asociadas con el estrés o infección por *H. pylori*, daño causado por reflujo esofágico, enfermedad inflamatoria intestinal, daño causado por cáncer del tracto

10 digestivo, intolerancia a los alimentos, incluida la enfermedad celíaca, o úlceras inducidas por AINES u otros medicamentos ingeridos o administrados sistémicamente.

Por lo tanto, la invención pretende proporcionar aglutinantes de TNF mejorados que son variantes de la

15 Referencia A y que tienen una unión reducida por factores interferentes (generalmente denominados "anticuerpos preexistentes" o "PEA") que pueden estar presentes en los sueros de algunos sujetos humanos, así como de pacientes. Se hace referencia a WO 2012/ 75741, WO 2013/024059 y también,

20 por ejemplo, a Holland et al. (J. Clin. Immunol., 2013, 33 (7):1192-203), así como a la solicitud PCT publicada pendiente de aprobación WO2015/173325 (Solicitud No. PCT/EP2015/060643) presentada por Ablynx NV el 13 de mayo de 2015 y titulada "Dominios Variables de Inmunoglobulina Mejorados".

Como se describe adicionalmente en el presente documento, los aglutinantes de TNF de la invención preferiblemente tienen la misma combinación de CDR (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) que está presentes en la Referencia A.

5 Algunos aglutinantes de TNF preferidos pero no limitantes de la invención se enumeran en la Figura 3 como SEQ ID NOS: 8 a 41, 62, 63, 64, 65, 66 y 69. La Figura 4 muestra un alineamiento de las secuencias SEQ ID NO: 8-41 como la de la SEQ ID NO: 1 (Referencia A) y la SEQ ID NO: 58
10 (PMP6C11).

Los aglutinantes de las SEQ ID NO: 22 a 41, 62 a 66 y 69 son ejemplos de aglutinantes de TNF de la invención que tienen una extensión de alanina C-terminal, es decir, un residuo de alanina en el extremo C-terminal de la secuencia
15 ISVD (también a veces denominada "posición 114") en comparación como la de la Secuencia C-terminal habitual VTVSS (SEQ ID NO: 55, como está presente en la Referencia A). Como se describe en el documento WO 2012/175741 (pero también, por ejemplo, en los documentos WO 2013/024059 y WO2015/173325),
20 esta extensión de alanina C-terminal puede evitar la unión de los denominados "anticuerpos preexistentes" (supuestamente IgG) a un epítoto putativo que está situado en la región C-terminal del ISVD. Se supone que este epítoto incluye, entre otros residuos, los residuos de aminoácidos expuestos en la

superficie de la secuencia C-terminal VTVSS así como el residuo de aminoácido en la posición 14 (y los residuos de aminoácidos próximos/ cercanos a la misma en la amino secuencia de ácido, tal como las posiciones 11, 13 y 15) y
5 también puede comprender el residuo de aminoácido en la posición 83 (y los residuos de aminoácido próximos a la misma, en la secuencia de aminoácidos, tales como las posiciones 82, 82a, 82b y 84) o el residuo de aminoácido en la posición 108 (y los residuos de aminoácidos próximos a la
10 misma en la secuencia de aminoácidos, tal como la posición 107).

Sin embargo, aunque la presencia de dicha alanina C-terminal (o una extensión C-terminal en general) puede reducir en gran medida (y en muchos casos incluso prevenir
15 esencialmente por completo) la unión de los "anticuerpos preexistentes" que se pueden encontrar en los sueros de una serie de sujetos (tanto sujetos sanos como pacientes), se ha encontrado que los sueros de algunos sujetos (como los sueros de pacientes con algunas enfermedades inmunes como la LES)
20 pueden contener anticuerpos preexistentes que puede unirse a la región C-terminal de un ISVD (cuando dicha región está expuesta) incluso cuando el ISVD contiene dicha alanina C-terminal (o más generalmente, tal extensión C-terminal). Se hace referencia nuevamente a la solicitud PCT publicada

pendiente de aprobación WO2015/173325 presentada por el cesionario el 13 de mayo de 2015 y titulada "Dominios Variables de Inmunoglobulina Mejorados".

Por consiguiente, un objetivo específico de la invención es proporcionar aglutinantes de TNF que son variantes mejoradas del Nanoanticuerpo anti-TNF al que se hace referencia aquí como "Referencia A" y que tienen una unión reducida por los llamados "anticuerpos preexistentes", y en particular del tipo descrito en WO2015/173325 (es decir, aquellos anticuerpos preexistentes que pueden unirse a una región C-terminal expuesta de un ISVD incluso en presencia de una extensión C-terminal).

Generalmente, la invención logra este objetivo proporcionando secuencias de aminoácidos que son variantes de la secuencia de SEQ ID NO: 1 que comprenden los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación como la SEQ ID NO: 1):

- 89T; o
- 89L en combinación con 11V; o
- 89L en combinación con 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 112K o 112Q; o
- 89L en combinación con 11V y 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 11V y 112K o 112Q; o
- 11V en combinación con 110K o 110Q; o

12

- 11V en combinación con 112K o 112Q.

En particular, en los aglutinantes de TNF proporcionados por la invención:

El residuo de aminoácido en la posición 11 se elige
5 preferiblemente de L o V.

El residuo de aminoácido en la posición 89 preferiblemente se elige de T, V o L.

El residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de T, K o Q.

10 El residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de S, K o Q.

Donde (i) la posición 89 es T; o (ii) la posición 89 es L y la posición 11 es V; o (iii) la posición 89 es L y la posición 110 es K o Q; o (iv) la posición 89 es L y la
15 posición 112 es K o Q; o (v) la posición 89 es L y la posición 11 es V y la posición 110 es K o Q; o (vi) la posición 89 es L y la posición 11 es V y la posición 112 es K o Q; o (vii) la posición 11 es V y la posición 110 es K o Q; o (viii) la posición 11 es V y la posición 112 es K o Q.

20 De las secuencias de aminoácidos proporcionadas por la invención, las secuencias de aminoácidos en las que la posición 89 es T o en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L (opcionalmente en combinación adecuada con una mutación 110K o 110Q o una mutación 112K o 112Q, y en

13

particular en combinación con una mutación 110K o 110Q), son particularmente preferidas. Aún más preferidas son las secuencias de aminoácidos en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L, opcionalmente con una mutación 110K o 110Q.

5 En una realización particularmente preferida, en los aglutinantes de TNF proporcionados por la invención, el residuo de aminoácido en la posición 11 es V, el residuo de aminoácido en la posición 89 es L, el residuo de aminoácido en la posición 110 es T y el residuo de aminoácido en la

10 posición 112 es S.

En una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a aglutinantes de TNF, tales como dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), que tienen:

15 - Una CDR1 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5).

- Una CDR2 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6).

- Una CDR3 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4), y tener:

20

- Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al

menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%.

- No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, puede encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR.

- El residuo de aminoácido en la posición 11 es V.
- El residuo de aminoácido en la posición 89 es L.
- El residuo de aminoácido en la posición 110 es T.
- El residuo de aminoácido en la posición 112 es S.
- El residuo de aminoácido en la posición 49 es A.
- El residuo de aminoácido en la posición 74 es S.

Como se mencionó, las secuencias de aminoácidos proporcionadas por la invención descrita en este documento pueden unirse (y en particular, pueden unirse específicamente) a TNF.

Las secuencias de aminoácidos proporcionadas por la invención preferiblemente tienen valor EC50 en el ensayo

basado en células usando las células KYM descritas en el Ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 50 nm, más preferiblemente 25 nm, aún mejor menos de 10 nm.

La Tabla B enumera algunas posibles combinaciones no limitativas de los residuos de aminoácidos que pueden estar presentes en las posiciones 11, 89, 110 y 112 de los aglutinantes de TNF de la invención. Las combinaciones que son particularmente preferidas se indican en negritas, y las combinaciones aún más preferibles se indican en negritas/
subrayadas.

Sin embargo, al optimizar las secuencias ("optimización de secuencia") de los aglutinantes de TNF con respecto a minimizar o eliminar sitios de unión para anticuerpos preexistentes, por un lado, y humanizar, por otro lado, diversas propiedades de los aglutinantes de TNF, incluyendo la estabilidad, fueron (notablemente) influenciadas negativamente. En particular, la temperatura de fusión como medida para la estabilidad física disminuyó, la producción tanto en el hospedador eucariótico POR EJEMPLO, *pastoris* como en el huésped procariótico *E. coli* disminuyó, y la estabilidad en los fluidos GI se redujo.

En lugar de "mutar" los sitios de unión para PEA y las mutaciones humanizadoras, comprometiendo así la optimización de la secuencia, los presentes inventores encontraron

sorprendentemente que los residuos de aminoácidos 49 o 74 podrían alterarse de manera que se satisfacen ambos requisitos aparentemente mutuamente excluyentes. Las tablas B-1 y B-2 enumeran algunas posibles combinaciones no limitativas de los residuos de aminoácidos que pueden estar presentes en las posiciones 11, 89, 110, 112, 49 o 74 en los aglutinantes de TNF de la invención.

Los aglutinantes de TNF proporcionados por la invención se describen adicionalmente en la descripción, Ejemplos y Figuras de la presente memoria, es decir, tienen CDR y tienen un grado global de identidad de la secuencia (como se define en este documento) en la secuencia de SEQ ID NO: 1, o pueden tener un número limitado de "diferencias de aminoácidos" (como se describe en este documento) con (una de) las secuencias de referencia.

Los aglutinantes de TNF de la invención comprenden preferiblemente las siguientes CDR (de acuerdo con la numeración de Kabat):

- Una CDR1 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 2).

- Una CDR2 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 3).

- Una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4).

Alternativamente, cuando las CDR se administran de acuerdo con la convención AbM, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden preferiblemente las siguientes CDR:

5 - Una CDR1 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5).

 - Una CDR2 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6).

 - Una CDR3 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4).

10 Un aglutinante de TNF de la invención preferiblemente también tiene:

 - Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta
15 para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%.

 - No más de 7, preferiblemente no más de 5, más preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1
20 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en las posición(es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la

SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR).

- 5** Con respecto a los diversos aspectos y aspectos preferidos de los aglutinantes de TNF de la invención, cuando se trata del grado de identidad de la secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 1 o el número y tipo de "diferencias de aminoácidos" que pueden estar presentes en dicho aglutinante
- 10** de la invención (es decir, en comparación como la SEQ ID NO: 1), debe observarse que, cuando se dice que (i) una secuencia de aminoácidos de la invención tiene un grado de identidad de la secuencia como el de la SEQ ID NO: 1 de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al
- 15** menos 95% (en el que las CDR, cualquier extensión C-terminal que pueda estar presente, así como las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 o 112 requeridas por el aspecto específico involucrado, no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia); o cuando
- 20** se dice que (ii) una secuencia de aminoácidos de la invención no tiene más de 7, preferiblemente no más de 5, tal como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" como la SEQ ID NO: 1 (nuevamente, sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente y sin tener en cuenta las mutaciones

en las posiciones 11, 89, 110 o 112 requeridas por el aspecto específico involucrado), entonces esto también incluye secuencias que no tienen diferencias de aminoácidos como la SEQ ID NO: 1 distinta de las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 o 112 requeridas por el aspecto específico implicado) y cualquier extensión C-terminal que pueda estar presente.

Por lo tanto, en un aspecto específico de la invención, los aglutinantes de TNF de la invención pueden tener una identidad de secuencia del 100% como la de la SEQ ID NO: 1 (incluyendo las CDR, pero sin tener en cuenta la mutación o combinaciones de mutaciones en las posiciones 11, 49, 74 89, 110 o 112 descritas en este documento, o cualquier extensión C-terminal que pueda estar presente) o pueden no tener diferencias de aminoácidos como la de la SEQ ID NO: 1 (es decir, diferente de la mutación(es)) o combinación de mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 o 112 descritas en el presente documento y cualquier extensión C-terminal que pueda encontrarse).

Cuando cualquier diferencia de aminoácidos está presente (es decir, además de cualquier extensión C-terminal y las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 o 112 que son requeridas por el aspecto específico de la invención involucrado), estas diferencias de aminoácidos pueden estar presentes en las CDR o en las regiones marco, pero

preferiblemente están presentes sólo en las regiones marco (tal como se define en la convención AbM, es decir, no en las CDR definidas según la convención AbM), es decir, que los aglutinantes TNF de la invención tienen las mismas CDR (definidas de acuerdo con la convención AbM) que están presentes en la SEQ ID NO: 1.

Además, cuando un aglutinante de TNF de la invención según cualquier aspecto de la invención tiene una o más diferencias de aminoácidos como la SEQ ID NO: 1 (además de las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 o 112 que se requieren por el aspecto específico implicado), entonces algunos ejemplos específicos, pero no limitantes, de tales mutaciones/ diferencias de aminoácidos que pueden estar presentes (es decir, en comparación con las secuencias de la SEQ ID NO: 1) son, por ejemplo, E1D, P40A, P40L, P40S (y en particular P40A), S49A, A74S, L78V, T87A o cualquier combinación adecuada de los mismos. Además, los aglutinantes de TNF de la invención pueden comprender adecuadamente (una combinación adecuada de) mutaciones D60A, E61D o P62S, en particular como un motivo ADS en las posiciones 60-62 (ver la SEQ ID NO: 39 para un ejemplo no limitante). Otros ejemplos de mutaciones son (una combinación adecuada de) una o más sustituciones "humanizadas" adecuadas; se hace referencia, por ejemplo, al documento WO 2009/138519 (o en la técnica

anterior citada en WO 2009/138519) y WO 2008/020079 (o en la técnica anterior citada en WO 2008/020079), así como a los cuadros A-3 a A-8 del documento WO 2008/020079 (que son listas que muestran posibles sustituciones humanizadas).

5 De las mutaciones mencionadas anteriormente, se prefiere la presencia de una mutación S49A, A74S o L78V (o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las dos, incluyendo las tres de la misma) (ver las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63). La Figura 5 muestra un alineamiento de las
10 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NOs: 36 a 41.

Además, cuando los aglutinantes de TNF de la invención están presentes en o forman la parte N-terminal del polipéptido o compuesto en el que están presentes, entonces preferiblemente contienen una D en la posición 1 (es decir,
15 una mutación E1D en comparación con la Referencia A). Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido de la invención (que se describe adicionalmente en la presente memoria) que tiene un aglutinante de TNF de la invención (que es como se describe
20 adicionalmente en el presente documento) en su extremo N-terminal, donde dicho TNF aglutinante de la invención tiene una D en la posición 1.

De forma similar, cuando se usa un aglutinante de TNF de la invención en formato monovalente, preferiblemente tiene

una extensión X(n) C-terminal como se describe en la presente memoria y una D en la posición 1.

Algunos ejemplos preferidos pero no limitantes de aglutinantes de TNF monovalentes con una D en la posición 1 y una extensión C-terminal se dan como en las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63, preferiblemente en las SEQ ID NO: 36, 39 y 40, más preferiblemente en la SEQ ID NO: 40. A este respecto, debe observarse que los aglutinantes de TNF de las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63 también pueden usarse en un compuesto o polipéptido de la invención que no está en un formato monovalente. En ese caso, cuando los aglutinantes de TNF de las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63 tendrán preferiblemente una E en lugar de una D en su extremo N-terminal (es decir, una mutación D1E comparada con las secuencias de las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63) cuando no están presentes en el extremo N-terminal de dicho polipéptido o compuesto de la invención (en cambio, preferiblemente, el ISVD N-terminal de dicho polipéptido o compuesto de la invención tendrá una D en la posición 1, además, preferiblemente no contendrán una extensión C-terminal (tal como la alanina C-terminal presente en las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63) cuando no están presentes en el extremo C-terminal del compuesto o polipéptido (en cambio,

preferiblemente, el C-terminal ISVD de dicho polipéptido o compuesto de la invención tendrá una extensión C-terminal).

Por medio de ejemplos preferidos, pero no limitantes, las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38 y 62-63 son también
5 ejemplos de aglutinantes de TNF de la invención que tienen diferencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 1, es decir, S49A, A74S o L78V. Por lo tanto, en un aspecto específico, la invención se refiere a aglutinantes de TNF de la invención (es decir, que tienen mutaciones en las
10 posiciones 11, 89, 110 o 112 como se describe aquí y también como se describe en el presente documento) que al menos tienen una combinación adecuada de una mutación S49A, A74S o L78V, y preferiblemente una combinación adecuada de cualquiera de estas dos mutaciones, tales como tres de estas
15 mutaciones.

Los aglutinantes de TNF de la invención, cuando se usan en un formato monovalente o cuando están presentes en o forman el extremo C-terminal de la proteína, polipéptido u otro compuesto o constructo en el que están presentes (o
20 cuando de lo contrario, tienen un extremo C-terminal "expuesto" en dicha proteína, polipéptido u otro compuesto o constructo, por lo que generalmente se entiende que el extremo C-terminal del ISVD no está asociado con una dominio constante (como el dominio CH1), se hace referencia

nuevamente a los documentos WO 2012/175741 y WO 2015/1733256), preferiblemente también tienen una extensión C-terminal de la fórmula $(X)_n$, en la que n es 1 a 10, preferiblemente 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y
5 preferiblemente 1 o 2, como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se selecciona independientemente entre los residuos de aminoácidos de origen natural (aunque según un aspecto preferido, no comprende ningún residuo de cisteína), y
10 preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I).

Según algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de tales extensiones C-terminal $X(n)$, X y n pueden ser como
15 sigue:

- (a) $n = 1$ y $X = \text{Ala}$
- (b) $n = 2$ y cada $X = \text{Ala}$
- (c) $n = 3$ y cada $X = \text{Ala}$
- (d) $n = 2$ y al menos un $X = \text{Ala}$ (con los residuos de
20 aminoácidos restantes X , independientemente seleccionados de cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

(e) $n = 3$ y al menos un $X = \text{Ala}$ (con los residuos de aminoácidos restantes X , independientemente seleccionados de

cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

(f) $n = 3$ y al menos dos $X = \text{Ala}$ (con los residuos de aminoácidos restantes X , independientemente seleccionados de cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

(g) $n = 1$ y $X = \text{Gly}$

(h) $n = 2$ y cada $X = \text{Gly}$

(i) $n = 3$ y cada $X = \text{Gly}$

(j) $n = 2$ y al menos un $X = \text{Gly}$ (con los residuos de aminoácidos restantes X , independientemente seleccionados de cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

(k) $n = 3$ y al menos un $X = \text{Gly}$ (con los residuos de aminoácidos restantes X , independientemente seleccionados de cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

(l) $n = 3$ y al menos dos $X = \text{Gly}$ (con los residuos de aminoácidos restantes X , independientemente seleccionados de cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

(m) $n = 2$ y cada $X = \text{Ala}$ o Gly

(n) $n = 3$ y cada $X = \text{Ala}$ o Gly

(o) $n = 3$ y al menos un $X = \text{Ala}$ o Gly (con los residuos

de aminoácidos restantes X, independientemente seleccionados de cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

5 (p) $n = 3$ y al menos dos $X = \text{Ala}$ o Gly (con los residuos de aminoácidos restantes X, independientemente seleccionados de cualquier aminoácido de origen natural, pero preferentemente elegidos independientemente de Val, Leu o Ile).

10 Siendo los aspectos (a), (b), (c), (g), (h), (i), (m) y (n) particularmente preferidos, siendo los aspectos en los que $n = 1$ o 2 los preferidos y los aspectos en donde $n = 1$, aún más particularmente preferidos.

También se debe observar que, preferiblemente, cualquier
15 extensión C-terminal presente en un aglutinante de TNF de la invención no contiene un residuo de cisteína (libre) (a menos que dicho residuo de cisteína se use o se destine a la funcionalización adicional, por ejemplo para la pegilación).

Algunos ejemplos específicos, pero no limitantes de
20 extensiones C-terminal útiles son las siguientes secuencias de aminoácidos: A, AA, AAA, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA o GAG.

Cuando los aglutinantes de TNF de la invención contienen mutaciones en las posiciones 110 o 112 (opcionalmente en

combinación con mutaciones en la posición 11 o 89 como se describe en este documento), los residuos de aminoácidos C-terminales del marco 4 (comenzando desde la posición 109) pueden ser como sigue: (i) si no está presente la extensión

5 C-terminal: VTVKS (SEQ ID NO: 43), VTVQS (SEQ ID NO: 44), VKVSS (SEQ ID NO: 45) o VQVSS (SEQ ID NO: 46); o (ii) si está presente una extensión C-terminal: VTVKSX(n) (SEQ ID NO: 47), VTVQSX(n) (SEQ ID NO: 48), VKVSSX(n) (SEQ ID NO: 49) o VQVSSX(n) (SEQ ID NO: 50), tal como VTVKSA (SEQ ID NO: 51),

10 VTVQSA (SEQ ID NO: 52), VKVSSA (SEQ ID NO: 53) o VQVSSA (SEQ ID NO: 54). Cuando los aglutinantes de TNF de la invención no contienen mutaciones en las posiciones 110 o 112 (pero solo mutaciones en la posición 11 o 89 como se describe en este documento), los residuos de aminoácidos C-terminales del

15 marco 4 (comenzando desde la posición 109) usualmente son:

- (i) Cuando no está presente una extensión C-terminal: VTVSS (SEQ ID NO: 55) (como en la secuencia de SEQ ID NO: 1).
 - (ii) Cuando está presente una extensión C-terminal: VTVSSX(n) (SEQ ID NO: 56) tal como VTVSSA (SEQ ID NO: 57). En
- 20** estas secuencias C-terminales, X y n son como se definen aquí para las extensiones C-terminal.

Como se puede ver a partir del alineamiento en la Figura 4 así como en la Figura 3, los aglutinantes de TNF de las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63 tienen una

mutación E1D y una extensión de alanina C-terminal. Como se mencionó, la presencia tanto de una D en la posición 1 como de una extensión C-terminal hace que estos aglutinantes de TNF (y otros aglutinantes de TNF de la invención con una D en la posición 1 y una extensión C-terminal) sean particularmente adecuados para su uso en un formato monovalente (es decir, para los fines descritos en este documento).

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un aglutinante de TNF de la invención (que se describe adicionalmente en la presente memoria) que tiene una D en la posición 1 y una extensión C-terminal X(n) (que es preferiblemente un único residuo de Ala). Dichos aglutinantes de TNF son preferiblemente (usados o destinados para su uso) en un formato monovalente. En un aspecto específico, dicho aglutinante de TNF monovalente se elige de las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 62, 63 y 41.

Algunos ejemplos preferidos pero no limitantes de aglutinantes de TNF de la invención se dan en las SEQ ID NO: 8 a 41 y 62-69, y cada una de estas secuencias forma un aspecto adicional de la invención (como lo hacen las proteínas, polipéptidos u otros compuestos o constructos que comprenden una de estas secuencias).

Algunos aglutinantes de TNF particularmente preferidos

de la invención son las secuencias de las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63 (o, como se describe en la presente memoria, variantes de las mismas con una E en la posición 1), o sin una extensión C-terminal, dependiendo de su uso pretendido en un polipéptido o compuesto de la invención).

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

- Una CDR1 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 2).

- Una CDR2 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 3).

- Una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4), y tener:

- Un grado de identidad de la secuencia como la de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%, o:

- De no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de

aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR); y opcionalmente tener:

10 - Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige
15 independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); en el cual:

 - El residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V.

20 - El residuo de aminoácido en la posición 89 es preferiblemente elegido adecuadamente de T, V o L; y - el residuo de aminoácido en la posición 110 preferiblemente se elige de T, K o Q; y - el residuo de aminoácido en la posición 112 preferiblemente se elige de S, K o Q; tal que

31

- (i) la posición 89 es T; o (ii) la posición 89 es L y la posición 11 es V; o (iii) la posición 89 es L y la posición 110 es K o Q; o (iv) la posición 89 es L y la posición 112 es K o Q; o (v) la posición 89 es L y la posición 11 es V y la posición 110 es K o Q; o (vi) la posición 89 es L y la posición 11 es V y la posición 112 es K o Q; o (vii) la posición 11 es V y la posición 110 es K o Q; o (viii) la posición 11 es V y la posición 112 es K o Q.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una
10 Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

- Una CDR1 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 2).
- Una CDR2 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 3).
- 15** - Una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4); y tener:
 - Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta
 - 20** para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%; o
 - No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de

aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR); y opcionalmente tener:

- 10** - Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige
- 15** independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); cuyo Dominio Variable Único de Inmunoglobulina comprende los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación como la de la secuencia de aminoácidos de la SEQ
- 20** ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 89T; o
- 89L en combinación con 11V; o
- 89L en combinación con 110K o 110Q; o

33

- 89L en combinación con 112K o 112Q; o
- 89L en combinación con 11V y 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 11V y 112K o 112Q; o
- 11V en combinación con 110K o 110Q; o
- 5 - 11V en combinación con 112K o 112Q.

En particular, los aglutinantes de TNF de la invención preferiblemente tienen no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos (como se define aquí, y no toman

10 en cuenta cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente en las posiciones 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (en el que dichas diferencias

15 de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las estructuras o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en las estructuras y no en las CDR). En particular, en los aglutinantes de TNF proporcionados por la invención, el residuo de aminoácido en la posición 11 es

20 V, el residuo de aminoácido en la posición 89 es L, el residuo de aminoácido en la posición 110 es T y el residuo de aminoácido en la posición 112 es S.

Como se describe aquí, algunos ejemplos específicos, pero no limitantes, de tales mutaciones/ diferencias de

aminoácidos que pueden estar presentes (es decir, en una combinación adecuada) son, por ejemplo, E1D, P40A, P40L, P40S (y en particular P40A), S49A, A74S, L78V, T87A o cualquier combinación adecuada de los mismos, así como por ejemplo (una
5 combinación adecuada de) mutaciones D60A, E61D o P62S (en particular como un motivo ADS en las posiciones 60-62) y (una combinación adecuada de, véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 39) una o más sustituciones "humanizadas" adecuadas. Como también se mencionó, se prefiere la presencia de una mutación S49A,
10 A74S o L78V (o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las dos, incluidos los tres de la misma) (así como la presencia de una D en la posición 1 cuando el aglutinante de TNF es presente en o forma el extremo N-terminal de un compuesto o polipéptido de la invención o está en formato
15 monovalente).

En un aspecto preferido, el aglutinante de TNF de la invención tal como un ISVD comprende una alanina en la posición 49 (A49).

En un aspecto preferido adicional, el aglutinante de TNF
20 de la invención tal como un ISVD comprende una serina en la posición 74 (S74).

En un aspecto preferido adicional, el aglutinante de TNF de la invención tal como un ISVD comprende una asparagina en la posición 73 (N73) o una lisina en la posición 75 (K75).

Como se menciona, en la invención, las secuencias de aminoácidos en cuya posición 89 es T o en donde la posición 11 es V y la posición 89 es L (opcionalmente en combinación adecuada con una mutación 110K o 110Q o una mutación 112K o 112Q, y en particular en combinación con una mutación 110K o 110Q) son particularmente preferidos. Aún más preferidas son las secuencias de aminoácidos en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L, opcionalmente con una mutación 110K o 110Q.

Por lo tanto, en un aspecto preferido, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

- Una CDR1 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 2).
- Una CDR2 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 3).
- Una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4); y tener:
- Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%; o

- No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en
5 posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero
10 preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR); y opcionalmente tener:

- Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de
15 aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); en el cual:

20 - El residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V; y

- El residuo de aminoácido en la posición 89 es T; y

- El residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de T, K o Q (y es preferiblemente T); y

- El residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de S, K o Q (y preferiblemente S).

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

5 - una CDR1 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 2); y

- Una CDR2 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 3); y

10 - Una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4); y tener:

- Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al **15** menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%; o

- No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta **20** ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes,

pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR); y opcionalmente tener:

- Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); en el cual:

- El residuo de aminoácido en la posición 11 es V; y
 - El residuo de aminoácido en la posición 89 es L; y
 - El residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de T, K o Q; y

- El residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de S, K o Q.

En un aspecto específico, pero no limitante, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 11V en combinación con 89L; o
- 11V en combinación con 110K o 110Q;

- 11V en combinación con 112K o 112Q;
- 11V en combinación con 89L y 110K o 110Q; o
- 11V en combinación con 89L y 112K o 112Q.

5 Tienen CDR (según Kabat) y un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

En otro aspecto específico, pero no limitante, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación
10 como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 89L en combinación con 11V; o
- 89L en combinación con 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 112K o 112Q; o
- 15 - 89L en combinación con 11V y 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 11V y 112K o 112Q.

Tienen CDR (según Kabat) y un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

20 En otro aspecto específico, pero no limitante, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 110K o 110Q en combinación con 11V; o
- 110K o 110Q en combinación con 89L; o
- 110K o 110Q en combinación con 11V y 89L.

5 Tienen CDR (según Kabat) y un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

En otro aspecto específico, pero no limitante, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación
10 como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 112K o 112Q en combinación con 11V; o
- 112K o 112Q en combinación con 89L; o
- 112K o 112Q en combinación con 11V y 89L.

15 Tienen CDR (según Kabat) y un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

En otro aspecto, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden una T en la posición 89 y tienen CDR (según Kabat)
20 y tienen un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

En otro aspecto, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden una V en la posición 11 y una L en la posición 89

y tienen CDR (según Kabat) y tienen un grado general de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describen en este documento.

Como se mencionó, los aglutinantes de TNF de la invención de acuerdo con los aspectos anteriores son preferiblemente además tales que contienen una combinación adecuada de una mutación S49A, A74S o L78V, y preferiblemente una combinación adecuada de cualquiera de estas dos mutaciones, tales como todas tres de estas mutaciones (y de nuevo, cuando el aglutinante de TNF es monovalente o está presente en el extremo N-terminal de un compuesto o polipéptido de la invención, preferiblemente también una mutación E1D).

En otro aspecto, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

- Una CDR1 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y
- Una CDR2 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y
- Una CDR3 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4); y tener:
- Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta

para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%; o

- No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR); y opcionalmente tener:

- Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I) ; en el cual:

- El residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V; y

- El residuo de aminoácido en la posición 89 preferiblemente se elige de T, V o L; y

- El residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de T, K o Q; y

5 - El residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de S, K o Q.

Donde, (i) la posición 89 es T; o (ii) la posición 89 es L y la posición 11 es V; o (iii) la posición 89 es L y la posición 110 es K o Q; o (iv) la posición 89 es L y la posición 112 es K o Q; o (v) la posición 89 es L y la posición 11 es V y la posición 110 es K o Q; o (vi) la posición 89 es L y la posición 11 es V y la posición 112 es K o Q; o (vii) la posición 11 es V y la posición 110 es K o Q; o (viii) la posición 11 es V y la posición 112 es K o Q.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

- Una CDR1 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y

20 - Una CDR2 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y

- Una CDR3 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4); y tener:

- Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que

puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%; o

- 5** - No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y
- 10** sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en
- 15** las CDR); y opcionalmente tener:

- Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige
- 20** independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); cuyo Dominio Variable Único de Inmunoglobulina comprende los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en

comparación como la de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 89T; o
- 5** - 89L en combinación con 11V; o
- 89L en combinación con 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 112K o 112Q; o
- 89L en combinación con 11V y 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 11V y 112K o 112Q; o
- 10** - 11V en combinación con 110K o 110Q; o
- 11V en combinación con 112K o 112Q.

Como se menciona, cuando un aglutinante de TNF de la invención se usa en un formato monovalente o está presente en el extremo C-terminal de un compuesto de la invención (como se define en este documento), el aglutinante de TNF (y en consecuencia, el compuesto resultante de la invención) preferiblemente tiene una extensión C-terminal X(n), cuya extensión C-terminal puede ser como se describe aquí para los aglutinantes de TNF de la invención o como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325.

Como se menciona, en la invención, las secuencias de aminoácidos en cuya posición 89 es T o en donde la posición 11 es V y la posición 89 es L (opcionalmente en combinación adecuada con una mutación 110K o 110Q o una mutación 112K o

112Q, y en particular en combinación con una mutación 110K o 110Q) son particularmente preferidos. Aún más preferidas son las secuencias de aminoácidos en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L, opcionalmente con una mutación 110K o 110Q.

Por lo tanto, en un aspecto preferido, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

- Una CDR1 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y

- Una CDR2 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y

- Una CDR3 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4); y tener:

- Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%; o

- No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en

posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR); y opcionalmente tener:

- Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); en el cual:

- El residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V; y
 - El residuo de aminoácido en la posición 89 es T; y
 - El residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de T, K o Q (y es preferiblemente T); y
 - El residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de S, K o Q (y preferiblemente S).
- En otro aspecto preferido, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que tiene:

- Una CDR1 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y

- Una CDR2 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y

5 - Una CDR3 (según AbM) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4); y tener:

- Un grado de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que cualquier extensión C-terminal que **10** puede estar presente así como las CDR no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de la secuencia) de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%; o

- No más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no **15** más de 3, tales como solo 3, 2 o 1 "diferencias de aminoácidos" (como se define aquí, y no teniendo en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en posición (es) 11, 89, 110 o 112 que pueden estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda **20** estar presente) como la de la SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si se encuentran presentes, pueden encontrarse en los marcos o las CDR, pero preferiblemente están presentes sólo en los marcos y no en las CDR); y opcionalmente tener:

- Una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige
5 independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); en el cual:

- El residuo de aminoácido en la posición 11 es V; y
- 10** - El residuo de aminoácido en la posición 89 es L; y
- El residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de T, K o Q; y
- El residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de S, K o Q.

15 En un aspecto específico, pero no limitante, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 20** - 11V en combinación con 89L; o
- 11V en combinación con 110K o 110Q;
- 11V en combinación con 112K o 112Q;
- 11V en combinación con 89L y 110K o 110Q; o
- 11V en combinación con 89L y 112K o 112Q.

Tienen CDR (de acuerdo con AbM) y tienen un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

En otro aspecto específico, pero no limitante, los
5 aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 89L en combinación con 11V; o
- 10** - 89L en combinación con 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 112K o 112Q; o
- 89L en combinación con 11V y 110K o 110Q; o
- 89L en combinación con 11V y 112K o 112Q.

Tienen CDR (de acuerdo con AbM) y tienen un grado global
15 de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

En otro aspecto específico, pero no limitante, los
aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes
residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación
20 como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 110K o 110Q en combinación con 11V; o
- 110K o 110Q en combinación con 89L; o
- 110K o 110Q en combinación con 11V y 89L.

Tienen CDR (de acuerdo con AbM) y un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

En otro aspecto específico, pero no limitante, los
5 aglutinantes de TNF de la invención comprenden los siguientes
residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones en comparación
como la SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas
(numeración según Kabat):

- 112K o 112Q en combinación con 11V; o
- 10 - 112K o 112Q en combinación con 89L; o
- 112K o 112Q en combinación con 11V y 89L.

Tienen CDR (de acuerdo con AbM) y tienen un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

15 En otro aspecto, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden una T en la posición 89 y tienen CDR (según AbM) y tienen un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describe en este documento.

20 En otro aspecto, los aglutinantes de TNF de la invención comprenden una V en la posición 11 y una L en la posición 89 y tienen CDR (según AbM) y tienen un grado global de identidad de la secuencia como la de la SEQ ID NO: 1 que son como se describen en este documento.

Como se mencionó, los aglutinantes de TNF de la invención de acuerdo con los aspectos anteriores son preferiblemente además tales que contienen una combinación adecuada de una mutación S49A, A74S o L78V, y preferiblemente una combinación adecuada de cualquiera de estas dos mutaciones, tales como todas tres de estas mutaciones (y de nuevo, cuando el aglutinante de TNF es monovalente o está presente en el extremo N-terminal de un compuesto o polipéptido de la invención, preferiblemente también una mutación E1D).

En otro aspecto específico, pero no limitante, la invención se refiere a un aglutinante de TNF como se describe aquí que está en un formato monovalente, y en particular a un aglutinante de TNF como se describe aquí que está en un formato monovalente y que tiene una D en posición 1 (o una mutación E1D) y una extensión C-terminal X(n) como se describe en este documento (tal como un residuo de alanina C-terminal).

En otro aspecto específico, pero no limitativo, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos elegida de una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 39 , SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 62, SEQ

ID NO: 63, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 , SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68.

10 En otro aspecto específico, pero no limitativo, la invención se refiere a una Dominio Variable Único de Inmunoglobulina que consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos elegida de una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 39 , SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO 64, SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 63, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68.

Para los fines de la invención, el tracto digestivo consiste en la boca, la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), el intestino grueso (ciego, colon, recto) y el ano.

Para los fines de la invención, se entiende que el "tracto gastrointestinal" o "tracto gastrointestinal" incluye el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon),

el intestino grueso (ciego, colon, recto) y el ano. El término "digestión gástrica" como se usa en el presente documento se entiende que describe la digestión en el estómago, el intestino delgado o el intestino grueso.

5 El término "degradación gástrica" de un anticuerpo se usa en este documento para referirse a la degradación de un ISVD, compuesto o polipéptido de la invención en el estómago, intestino delgado, intestino grueso por enzimas endógenas o exógenas presentes en el estómago, intestino delgado e

10 intestino grueso o debido a la exposición a condiciones ácidas durante la digestión gástrica.

El término "ISVD estabilizado", "compuestos estabilizados" y "polipéptidos estabilizados" como se usan en este documento, se entiende que describe un ISVD, compuesto o

15 polipéptido, respectivamente, que se ha diseñado para hacerlo más estable a la degradación en el tracto digestivo cuando se administra tópicamente. En comparación con un ISVD, compuesto o polipéptido que no ha sido procesado o diseñado de acuerdo con la invención, un ISVD, compuesto o polipéptido

20 estabilizado que se diseña de acuerdo con la invención se degrada más lentamente o en menor grado mediante digestión gástrica, tales como la digestión por enzimas endógenas o exógenas presentes en el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o las condiciones ácidas presentes en el

estómago. Los "ISVD estabilizados", los "compuestos estabilizados" y los "polipéptidos estabilizados" también se denominan "ISVD con mayor estabilidad a la degradación en el tracto GI", "compuestos con estabilidad mejorada a la degradación en el tracto GI" y "polipéptidos con estabilidad mejorada" a la degradación en el tracto gastrointestinal", respectivamente.

La administración tópica de un ISVD, compuesto o polipéptido al tracto digestivo es una Desafío porque el tracto digestivo degrada y digiere los ISVDs, compuestos y polipéptidos aplicados tópicamente. En el estómago, el pH bajo y la proteasa pepsina degradan los ISVD, los compuestos y los polipéptidos ingeridos. En el intestino delgado, las enzimas tripsina y quimotripsina, entre otras, degradan los ISVD, compuestos y polipéptidos ingeridos. En el intestino grueso, las proteasas derivadas de bacterias degradan los ISVD, compuestos y polipéptidos ingeridos. Se preferirían ISVD, compuestos y polipéptidos con estabilidad mejorada a la digestión gástrica para la aplicación tópica al tracto GI.

Los ISVD, compuestos y polipéptidos estabilizados se pueden generar mediante la mutación de uno o más residuos de aminoácidos que son susceptibles a la degradación gástrica en residuos de aminoácidos que son resistentes a la degradación gástrica. Los ISVD, compuestos y polipéptidos estabilizados

se pueden generar mediante la mutación de múltiples residuos de aminoácidos que aumentan la estabilidad a la degradación gástrica.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a la
5 identificación de residuos de aminoácidos que imparten estabilidad del aglutinante de TNF de la invención y a la mejora de la estabilidad del aglutinante de TNF. Preferiblemente, el aglutinante de TNF es más resistente a la degradación gástrica por una o más de las condiciones de pH
10 bajo o las actividades de una o más proteasas tales como pepsina, tripsina, quimotripsina o proteasas derivadas de bacterias.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar un residuo de aminoácido que imparte
15 estabilidad a un ISVD, compuesto o polipéptido a la degradación gástrica que comprende las etapas de: (a) degradar un ISVD, compuesto o polipéptido por una o más proteasas en fragmentos ; y (b) analizar los fragmentos de la etapa (a) por un medio adecuado, tal como por ejemplo, LC-MS;
20 identificando de este modo el (los) residuo (s) de aminoácido que confiere estabilidad a un ISVD, compuesto o polipéptido a la degradación gástrica.

En una realización, la invención se refiere a un método para mejorar la estabilidad de un ISVD, compuesto o

polipéptido frente a la degradación gástrica que comprende los pasos (a) y (b) anteriores, seguido de: (c) mutar los residuos de aminoácidos que imparten estabilidad de un ISVD, compuesto o polipéptido a la degradación gástrica; y (d) **5** repetir los pasos (a) y (b) anteriores; por lo que la ausencia de uno o más fragmentos indica una estabilidad mejorada del ISVD, compuesto o polipéptido a la degradación gástrica.

En la presente descripción:

10 - El término "Dominio Variable Único de Inmunoglobulina" (también denominado "ISV" o "ISVD"), generalmente se usa para referirse a dominios variables de inmunoglobulina (que pueden ser dominios de cadena pesada o cadena ligera, incluidos dominios VH, VHH o VL) que puede formar un sitio de unión a **15** antígeno funcional sin interacción con otro dominio variable (por ejemplo, sin una interacción VH/VL tal como se requiere entre los dominios VH y VL del anticuerpo monoclonal convencional de 4 cadenas). Los ejemplos de ISVDs serán claros para la persona experta y por ejemplo incluyen **20** Nanocuerpos (que incluyen un VHH, un VHH humanizado o un VHH camelizado tal como VH humano camelizado), IgNAR, dominios, (un solo dominio) anticuerpos (tales como dAb's™) que son dominios VH o que se derivan de un dominio VH y anticuerpos (dominio único) (como dAb's™) que son dominios VL o que se

derivan de una Dominio VL. A menos que se mencione explícitamente lo contrario en este documento, generalmente se prefieren los ISVD que se basan o derivan de dominios variables de cadena pesada (tales como dominios VH o VHH).

- 5 Más preferiblemente, a menos que se indique explícitamente lo contrario en este documento, un ISVD será un Nanocuerpo.

- El término "Nanocuerpo" es generalmente como se define en WO 2008/020079 o WO 2009/138519, y por lo tanto en un aspecto específico generalmente denota un VHH, un VHH humanizado o un VH camelizado (como un VH humano camelizado) o generalmente un secuencia VHH optimizada (tal como, por ejemplo, optimizada para la estabilidad química o la solubilidad, superposición máxima con regiones marco humanas conocidas y máxima expresión). Se señala que los términos
- 10 Nanocuerpo o Nanocuerpos son marcas registradas de Ablynx N.V. y, por lo tanto, también pueden denominarse Nanocuerpo® o Nanocuerpos®).
- 15

- Generalmente, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, los ISVD, Nanocuerpos, polipéptidos, proteínas y otros compuestos y constructos a los que se hace
- 20 referencia estarán destinados a la profilaxis o el tratamiento de enfermedades o trastornos en el hombre (y opcionalmente también en animales de sangre caliente y en particular mamíferos). Por lo tanto, generalmente, los ISVD,

Nanocuerpos, polipéptidos, proteínas y otros compuestos y constructos descritos en este documento son preferiblemente tales que pueden usarse como, o pueden ser, adecuadamente, parte de, un fármaco (biológico) u otro producto farmacéutico o terapéuticamente activo, compuesto o de un producto o composición farmacéutica. Tal fármaco, compuesto o producto es preferiblemente tal que es adecuado para la administración a un ser humano, por ejemplo, para la profilaxis o el tratamiento de un sujeto que necesita tal profilaxis o tratamiento o, por ejemplo, como parte de un ensayo clínico. Como se describe adicionalmente aquí, para este fin, dicho fármaco o compuesto puede contener otros residuos, entidades o unidades de unión además de los ISVD proporcionados por la invención (que, como también se describe aquí, pueden ser, por ejemplo, uno o más residuos terapéuticos adicionales o uno o más residuos que influyen en las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del biológico basado en el ISVD o en el Nanocuerpo, como su vida media). Los ejemplos adecuados de dichos residuos terapéuticos u otros más serán claros para los expertos en la materia, y por ejemplo pueden incluir en general cualquier proteína, polipéptido u otro dominio de unión o unidad de unión terapéuticamente activa, así como, por ejemplo, modificaciones tales como las descritas en la página 149 a 152 del documento WO

2009/138159. Un biológico basado en ISVD o basado en Nanocuerpos es preferiblemente un producto terapéutico o destinado a uso como terapéutico (que incluye profilaxis y diagnóstico) y para este fin contiene preferiblemente de al
5 menos un ISVD contra un objetivo terapéuticamente relevante (Tales como por ejemplo, RANK-L, vWF, IgE, RSV, CXCR4, IL-23 u otras interleucinas, etc.).

Para algunos ejemplos específicos pero no limitativos de tales productos biológicos basados en ISVD o basados en
10 Nanocuerpo, se hace Referencia A los Ejemplos 8 a 18 y también, por ejemplo, a las diversas aplicaciones de Ablynx NV (tales como, por ejemplo y sin limitación, WO 2004/062551, WO 2006/122825, WO 2008/020079 y WO 2009/068627), así como, por ejemplo (y sin limitación), para aplicaciones tales como
15 WO 2006/038027, WO 2006/059108, WO 2007/063308, WO 2007/063311, WO 2007/066016 y WO 2007/085814. Además, como se describe adicionalmente en este documento, el residuo adicional puede ser un ISVD o Nanocuerpo como se describe aquí dirigido contra una proteína de suero (humana) tal como
20 albúmina de suero (humana), y tal ISVD o Nanocuerpo también pueden encontrar usos terapéuticos, en particular en o para extender la vida media de los aglutinantes de TNF descritos en este documento. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos WO 2004/041865, WO 2006/122787 y WO 2012/175400,

que generalmente describen el uso de Nanocuerpos de unión a suero-albúmina para la extensión de vida media. Además, en la presente descripción, a menos que se mencione explícitamente lo contrario, todos los términos mencionados aquí tienen el

5 significado dado en el documento WO 2009/138519 (o en la técnica anterior citada en WO 2009/138519) o WO 2008/020079 (o en la técnica anterior citado en el documento WO 2008/020079). Además, cuando un método o técnica no se describe específicamente aquí, se puede realizar como se

10 describe en el documento WO 2009/138519 (o en la técnica anterior citada en WO 2009/138519) o WO 2008/020079 (o en la técnica anterior citada en WO 2008/020079). También, como se describe aquí, cualquier producto farmacéutico o composición que comprende cualquier ISVD o compuesto de la invención

15 también puede comprender uno o más componentes adicionales conocidos per se para uso en productos farmacéuticos o composiciones (es decir, dependiendo de la forma farmacéutica prevista) o ejemplo, uno o más compuestos o principios activos destinados a uso terapéutico (es decir, para

20 proporcionar un producto de combinación).

Además, cuando se usan en la presente memoria descriptiva o en las reivindicaciones, los siguientes términos tienen el mismo significado que se proporcionan en, o cuando sea aplicable, se pueden determinar de la manera

descrita en las páginas 62-75 del documento WO 2009/138519:

"agonista", "antagonista", "agonista inverso", "residuo de aminoácido no cargado", "no cargado", "residuo de aminoácido polar sin carga", "residuo de aminoácido cargado, polar",

5 "identidad de la secuencia", "exactamente lo mismo" y "amino" "diferencia de ácido" (cuando se refiere a una comparación de secuencias de dos secuencias de aminoácidos), "esencialmente aislado (en forma)", "dominio", "dominio de unión", "determinante antigénico", "epítope", "anti" o "dirigido en
10 contra de (un antígeno)", "especificidad" y "vida media".

Además, los términos "modular", "sitio de interacción", "específico para", "bloque cruzado" y "esencialmente independiente del pH" son como se define en (o puede determinarse como se describe en las páginas 74-79 del
15 documento WO 2010/130832 de Ablynx NV. Además, cuando se hace referencia a un constructo, compuesto, proteína o polipéptido de la invención, términos como "monovalente", "ambivalente" (o "multivalente"), "bienespecífico" (o "multiespecífico") y "biparatopico" (o "multiparatopico"), pueden tener el
20 significado dado en WO 2009/138519, WO 2010/130832 o WO 2008/020079.

El término "vida media" como se usa aquí en relación con un ISVD, Nanocuerpo, biológico basado en ISVD, biológico basado en Nanocuerpos o cualquier otra secuencia de

aminoácidos, compuesto o polipéptido a los que se hace referencia en este documento, generalmente se pueden definir como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079 y como se menciona aquí se refiere

5 al tiempo necesario para que la concentración sérica de la secuencia de aminoácidos, compuesto o polipéptido se reduzca en un 50%, in vivo, por ejemplo debido a la degradación de la secuencia o compuesto o eliminación de la secuencia o compuesto por mecanismos naturales. La vida media in vivo de

10 una secuencia de aminoácidos, compuesto o polipéptido de la invención puede determinarse de cualquier manera conocida per se, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán claras para las personas expertas en la técnica y, por ejemplo, pueden ser, en general, las descritas

15 en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079.

Como también se menciona en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079, la vida media se puede expresar usando parámetros tales como $t_{1/2}$ -alfa, $t_{1/2}$ -beta y

20 el área bajo la curva (AUC). A este respecto, debe observarse que el término "vida media" como se usa en este documento en particular se refiere a la vida media $t_{1/2}$ -beta o terminal (en la que el $t_{1/2}$ -alfa o el AUC, o ambos pueden mantenerse fuera de consideraciones). Se hace referencia, por ejemplo, a

la parte experimental a continuación, así como a los manuales estándar, tales como Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and Peters et al, Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (1996).

5 También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicados por Marcel Dekker, 2nd Rev. Edición (1982). Del mismo modo, los términos "aumento en la vida media" o "vida media aumentada" también se definen en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079 y, en particular, se refieren a un aumento en el $t_{1/2}$ -beta, ya sea con o sin un aumento en el $t_{1/2}$ -alfa o el AUC o ambos.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente memoria, en el que dicho compuesto comprende además un residuo de unión a proteína de suero.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente memoria, en el que dicho residuo de unión a proteína de suero se une a la albúmina de suero.

20 Cuando un término no se define específicamente en el presente documento, tiene su significado habitual en la técnica, que será claro para el experto en la materia. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, tales como Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory

Manual" (2a.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al., Eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2^a edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt y col., "Immunology" (6^a edición), Mosby / Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10^a ed. Blackwell Publishing, Reino Unido (2001); y Janeway et al., "Immunobiology" (6^a edición), Garland Science Publishing / Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como los antecedentes generales citados en este documento. Además, como ya se ha indicado aquí, los residuos de aminoácidos de un Nanocuerpo se numeran de acuerdo con la numeración general para VH dada por Kabat et al. ("Secuencia de proteínas de interés inmunológico", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91), tal como se aplica a los dominios VHH de Camelids en el artículo de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Métodos 2000 23 de junio; 240 (1-2): 185-195; o referido aquí. De acuerdo con esta numeración, FR1 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 1-30, CDR1 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-35,

FR2 de un Nanocuerpo comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, FR3 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las

5 posiciones 66-94, CDR3 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102, y FR4 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113. [A este respecto, debe observarse que, como es bien conocido en la técnica para dominios VH y VHH,

10 el número total de residuos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponderse con el número total de aminoácidos. los residuos ácidos indicados por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupados en la secuencia

15 real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, en general, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácidos en la secuencia real. En general, sin

20 embargo, se puede decir que, de acuerdo con la numeración de Kabat e independientemente del número de residuos de aminoácidos en las CDR, la posición 1 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR1 y viceversa, posición 36 de acuerdo con la numeración de Kabat corresponde al inicio

de FR2 y viceversa, la posición 66 de acuerdo con la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR3 y viceversa, y la posición 103 de acuerdo con la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR4 y viceversa.].

5 Los métodos alternativos para numerar los residuos de aminoácidos de los dominios VH, que también se pueden aplicar de manera análoga a los dominios VHH de Camelids y Nanocuerpo, son el método descrito por Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989)), la denominada "definición de AbM" y la **10** denominada "definición de contacto". Sin embargo, en la presente descripción, aspectos y figuras, se seguirá la numeración según Kabat aplicada a los dominios VHH por Riechmann y Muyldermans, a menos que se indique lo contrario.

También debe observarse que las Figuras, cualquier **15** Listado de Secuencias y los Ejemplos Experimentales solo se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la misma o de las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera, a menos que se indique explícitamente lo contrario en este documento.

20 La invención también se refiere a proteínas, polipéptidos y otros constructos, moléculas o entidades químicas que comprenden o consisten esencialmente en los aglutinantes de TNF de la invención como se describe en la presente memoria (es decir, que comprenden o están

esencialmente constituidos por uno o más de dichos aglutinantes de TNF, como uno , dos o tres de dichos aglutinantes de TNF); a métodos para expresar / producir los aglutinantes de TNF de la invención o para expresar /

5 producir proteínas, polipéptidos y otros constructos, moléculas o entidades químicas que los comprenden; a composiciones y productos (tales como composiciones farmacéuticas y productos) que comprenden los aglutinantes de TNF de la invención o proteínas, polipéptidos y otros

10 constructos, moléculas o entidades químicas que los comprenden; a la secuencia de nucleótidos y ácidos nucleicos que codifican los aglutinantes de TNF de la invención o que codifican proteínas o polipéptidos que comprenden los mismos; y a usos (y en particular usos terapéuticos, profilácticos y

15 de diagnóstico) de los aglutinantes de TNF de la invención y de proteínas, polipéptidos y otros constructos, moléculas o entidades químicas que los comprenden.

Estos y otros aspectos, realizaciones, ventajas, aplicaciones y usos de la invención quedarán claros a partir

20 de la descripción adicional en este documento. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a proteínas (tales como proteínas de fusión), polipéptidos, constructos, compuestos u otras entidades químicas que comprenden o consisten esencialmente en al menos

un (tal como uno, dos o tres) aglutinantes de TNF de la invención (también denominados colectivamente "compuestos de la invención", "polipéptidos de la invención", "constructos de la invención" o "proteínas de fusión de la invención").

5 Por lo tanto, el compuesto de la invención puede ser un polipéptido.

Tales compuestos de la invención pueden contener, además del uno o más aglutinantes de TNF de la invención, además una o más secuencias de aminoácidos, entidades químicas o

10 residuos. Estas otras secuencias de aminoácidos, entidades químicas o residuos pueden conferir una o más propiedades deseadas al compuesto (resultante) de la invención o pueden alterar las propiedades del compuesto (resultante) de la invención de una manera deseada, por ejemplo para

15 proporcionar el compuesto (resultante) de la invención con una actividad biológica o terapéutica deseada (por ejemplo, para proporcionar el compuesto resultante de la invención con afinidad y preferentemente potencia contra otro objetivo terapéuticamente relevante de manera que el compuesto

20 resultante se vuelva "biespecífico" con respecto al TNF y ese otro objetivo terapéuticamente relevante), para proporcionar una vida media deseada o (de otro modo) modificar o mejorar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas, para dirigir el compuesto de la invención a células, tejidos u

órganos específicos (incluyendo células cancerosas y tejidos cancerosos), para proporcionar un efecto citotóxico o para servir como un marcaje o etiqueta detectable. Algunos ejemplos no limitantes de tales otras secuencias de aminoácidos, entidades químicas o residuos son:

- Uno o más enlazadores adecuados (como un enlazador 9GS, 15GS o 35GS); o
- Uno o más dominios de unión o unidades de unión que están dirigidos contra un objetivo terapéuticamente relevante distinto de TNF (es decir, para proporcionar un compuesto de la invención que es biespecífico tanto para el TNF como para el otro objetivo terapéuticamente relevante); o
- Uno o más dominios de unión o unidades de unión que proporcionan un aumento en la vida media (por ejemplo, un dominio de unión o unidad de unión que puede unirse contra una proteína de suero tal como albúmina de suero); o
- Uno o más dominios de unión o unidades de unión que se dirigen al compuesto de la invención a una célula, tejido u órgano deseado (tal como una célula cancerosa); o
- Uno o más dominios de unión o unidades de unión que proporcionan una especificidad aumentada frente a TNF (habitualmente, estos serán capaces de unirse a TNF pero, en general, por sí mismos, esencialmente no serán funcionales contra el TNF); o

- Un dominio de unión, unidad de unión u otra entidad química que permite que el compuesto de la invención se internalice en una célula (deseada) (por ejemplo, un Nanocuerpo anti-EGFR de internalización como se describe en el documento WO 2005/044858); o

- Un residuo que mejora la vida media tal como un grupo polietilenglicol adecuado (es decir, pegilación) o una secuencia de aminoácidos que proporciona una vida media aumentada tal como albúmina de suero humano o un fragmento adecuado de la misma (es decir, fusión de albúmina) o por ejemplo una albúmina de suero péptido de unión como se describe en WO 2008/068280; o

- Una carga útil tal como una carga útil citotóxica; o un marcaje o etiqueta detectable, tal como un radiomarcador o etiqueta fluorescente; o

- Un marcaje que puede ayudar con la inmovilización, detección o purificación del compuesto de la invención, tal como un marcaje HIS o FLAG3; o

- Un marcaje que puede funcionalizarse, como un marcaje C-terminal GGC o GGGC; o

- Una extensión C-terminal X(n), que puede ser como se describe adicionalmente aquí para los aglutinantes de TNF de la invención o como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325.

Aunque habitualmente menos preferido, tampoco se excluye del alcance de la invención que los compuestos de la invención también puedan contener una o más partes o fragmentos de un anticuerpo convencional (preferiblemente humano) (tal como una parte Fc o un fragmento funcional de la misma) o uno o más dominios constantes) o de un anticuerpo Camelid de cadena pesada solamente (tal como uno o más dominios constantes).

En un aspecto particular, la presente invención se refiere a un constructo que comprende o consiste esencialmente en un ISVD como se define aquí o un compuesto como se define aquí, y que comprende además uno o más otros grupos, residuos, residuos o unidades de unión, opcionalmente enlazados uno o más enlazadores peptídicos.

En un aspecto particular adicional, la presente invención se refiere a un constructo como se define en la presente memoria, en la que dichos uno o más grupos, residuos, residuos o unidades de unión se eligen del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas de suero o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a las proteínas de suero, una porción Fc, y proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas de suero.

Cuando los compuestos de la invención contienen uno o

más dominios de unión o unidades de unión adicionales (por ejemplo, un dominio de unión esencialmente no funcional o unidad de unión contra el TNF que proporciona una mayor especificidad contra el TNF, un dominio de unión o unidad de unión contra un objetivo terapéutico otro que TNF, un dominio de unión o unidad de unión contra un objetivo tal como albúmina de suero humano que proporciona una vida media aumentada, o un dominio de unión o unidad de unión que dirige el compuesto de la invención a una célula, tejido u órgano específico o que permite que el compuesto de la invención se internalice en una célula), estos otros dominios de unión o unidades de unión preferiblemente comprenden uno o más ISVD, y más preferiblemente son todos los ISVD. Por ejemplo y sin limitación, estos uno o más dominios de unión o unidades de unión adicionales pueden ser uno o más Nanocuerpos (incluyendo un VHH, un VHH humanizado o un VH camelizado tal como VH humano camelizado), un anticuerpo (dominio único) que es una Dominio VH o que se deriva de una Dominio VH, una DAb que está o consiste esencialmente en una Dominio VH o que se deriva de una Dominio VH, o incluso un anticuerpo de dominio (único) o una DAb que es o consiste esencialmente en dominio de VL, en particular, estos uno o más dominios de unión o unidades de unión, cuando están presentes, pueden comprender uno o más Nanocuerpos, y más en particular son todos

Nanocuerpos.

Cuando un compuesto de la invención tiene un ISVD en su extremo C-terminal (que ISVD C-terminal puede ser un aglutinante de TNF de la invención o puede ser, por ejemplo, si está presente en el compuesto de la invención, otro esencialmente no funcional ISVD contra el TNF que proporciona una mayor especificidad contra el TNF, una ISVD contra una diana terapéutica distinta de TNF, una ISVD contra un objetivo tal como albúmina de suero humano que proporciona una vida media aumentada, o una ISVD que dirige el compuesto de la invención a una célula, tejido u órgano específico o que permite que el compuesto de la invención se internalice en una célula), entonces el compuesto de la invención (es decir, dicho ISVD C-terminal) preferiblemente tiene una extensión C-terminal X(n), cuya extensión C-terminal puede ser como se describe en este documento para los aglutinantes de TNF de la invención o como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325.

Cuando un compuesto de la invención contiene, además del uno o más aglutinantes de TNF de la invención, cualquier ISVD adicional (que uno o más ISVD adicionales pueden, como se ha mencionado, ser un ISVD esencialmente no funcional adicional contra el TNF que proporciona un aumento de ISVD) especificidad contra el TNF, una ISVD contra una diana

terapéutica distinta de TNF, una ISVD contra una diana tal como albúmina de suero humano que proporciona una vida media aumentada, o una ISVD que dirige el compuesto de la invención a una célula específica, tejido u órgano o que permite que el

5 compuesto de la invención se internalice en una célula), y cuando tales ISVD adicionales son Nanocuerpos o son ISVD que son, que consisten esencialmente de o que se derivan de secuencias VH, entonces de acuerdo a un aspecto preferido de la invención, dicho uno o más (y preferiblemente todos) otros

10 ISVD presentes en el compuesto de la invención contendrán dentro de su secuencia una o más mutaciones de marco que reducen la unión por anticuerpos preexistentes. En particular, de acuerdo con este aspecto de la invención, dichos ISVD adicionales pueden contener (una combinación

15 adecuada de) residuos/ mutaciones de aminoácidos en las posiciones 11, 89, 110 o 112 que son como se describen en WO2015/173325 o que esencialmente son como se describen en este documento para los aglutinantes de TNF de la invención. En un aspecto específico, cuando el compuesto de la invención

20 tiene dicho ISVD en su extremo C-terminal (es decir, no tiene el aglutinante de TNF de la invención en su extremo C-terminal), entonces al menos dicho ISVD que está presente en o forma el extremo C-terminal tiene tales mutaciones de marco que reducen la unión por anticuerpos preexistentes (y dicho

ISVD C-terminal preferiblemente también tendrá una extensión X(n) C-terminal como se describe en este documento).

Como se mencionó, cuando el compuesto de la invención tiene una vida media aumentada (es decir, en comparación con el aglutinante de TNF monovalente de la invención), el compuesto de la invención preferiblemente contiene al menos un ISVD (y en particular Nanocuerpo) que proporciona una mayor vida media. Tal ISVD normalmente se dirigirá contra una proteína de suero adecuada tal como transferrina y en particular contra la albúmina de suero (humana). En particular, dicho ISVD o Nanocuerpo puede ser un anticuerpo (de un solo) dominio o dAb contra la albúmina de suero humano como se describe por ejemplo en los documentos EP 2 139 918, WO 2011/006915, WO 2012/175400, WO 2014/111550 y puede, en particular, ser un Nanocuerpo que se une a la albúmina de suero como se describe en los documentos WO 2004/041865, WO 2006/122787, WO 2012/175400 o WO2015 / 173325. Los ISVDs de unión a la albúmina de suero particularmente preferidos son Nanocuerpo Alb-1 (véase WO 2006/122787) o sus variantes humanizadas tales como Alb-8 (WO 2006/122787, SEQ ID NO: 62), Alb-23 (WO 2012/175400, SEQ ID NO: 1) y otras variantes humanizadas (y preferiblemente también optimizadas para la secuencia) de Alb-1 o variantes de Alb-8 o Alb-23 (o más generalmente el ISVD que tiene esencialmente las mismas CDR

que la Alb-1, Alb-8 y Alb-23).

De nuevo, como se mencionó, tal ISVD que se une a la albúmina de suero, cuando está presente, puede contener dentro de su secuencia una o más mutaciones estructurales que

5 reducen la unión por anticuerpos preexistentes. En particular, cuando tal ISVD de unión a la albúmina de suero es un anticuerpo Nanocuerpo o una Dominio (único) que consiste esencialmente en o se deriva de una Dominio VH, el ISVD que se une a la albúmina de suero puede contener (una

10 combinación adecuada de) residuos / mutaciones de aminoácido en las posiciones 11, 89, 110 o 112 que son como se describen en el documento WO2015/173325 o que son esencialmente como se describen en este documento para los aglutinantes de TNF de la invención. Por ejemplo, el documento WO2015/173325

15 describe una serie de variantes de Alb-1, Alb-8 y Alb-23 que contienen residuos/ mutaciones de aminoácidos en las posiciones 11, 89, 110 o 112 que reducen la unión por anticuerpos preexistentes que puede usarse en los compuestos de la invención.

20 En un aspecto particular pero no limitativo de la invención, la invención proporciona un compuesto, tal como un polipéptido, que comprende además de uno o más bloques de constructos, por ejemplo, ISVD, que unen el TNF, al menos una albúmina de suero que se une, tal como una albúmina de suero

que se une a ISVD, preferentemente uniéndola como se describe en la presente memoria, donde dicha albúmina de suero que se une al ISVD consiste esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4, respectivamente) y en 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en las que CDR1 es SFGMS, CDR2 es SISGSGSDTLYADSVKG y CDR3 es GGSLSR. Preferiblemente, dicha albúmina de suero humano que se une a ISVD se elige del grupo que consiste en Alb8, Alb23, Alb129, Alb132, Alb11, Alb11 (S112K) -A, Alb82, Alb82-A, Alb82-AA, Alb82-AAA, Alb82-G, Alb82-GG, Alb82-GGG, Alb92 o Alb223 (véase la Tabla D).

De nuevo, cuando dicha unión de albúmina de suero al ISVD está presente en el extremo C-terminal de un compuesto de la invención, la albúmina de suero que se une (y como resultado, el compuesto de la invención) preferiblemente tienen una extensión C-terminal X(n), cuya extensión C-terminal puede ser como se describe en este documento para los aglutinantes de TNF de la invención o como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325. También preferiblemente tiene mutaciones que reducen la unión de anticuerpos preexistentes, como (una combinación adecuada de) los residuos/ mutaciones de aminoácidos en las posiciones 11, 89, 110 o 112 descritas en WO2015/173325.

Sin embargo, como se menciona, otros medios para

aumentar la vida media de un compuesto de la invención (como pegilación, fusión a albúmina humana o un fragmento adecuado de la misma, o el uso de un péptido de unión a la albúmina de suero adecuado), aunque menos preferidos, también están
5 incluidos en el alcance de la invención.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención se refiere a un compuesto, en el que dicho residuo de unión a proteína de suero es un polipéptido no basado en anticuerpos.

10 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un compuesto, que comprende además PEG.

Generalmente, cuando un compuesto de la invención tiene una vida media aumentada (por ejemplo, mediante la presencia de un ISVD que aumenta la vida media o cualquier otra forma
15 adecuada de aumentar la vida media), el compuesto resultante de la invención tiene preferiblemente una vida media (como se define aquí) que es al menos 2 veces, preferiblemente de al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la vida media del aglutinante de TNF
20 monovalente de la invención (medido en el hombre o un modelo animal adecuado, tal como ratón o mono Cynomolgus). En particular, un compuesto de la invención preferiblemente tiene una vida media (como se define en la presente memoria) en sujetos humanos de al menos 1 día, preferiblemente de al

menos 3 días, más preferiblemente de al menos 7 días, tal como al menos 10 días.

A partir de la descripción en el presente documento quedará claro que los compuestos de la invención que se basan en uno o más ISVD pueden tener diferentes "formatos", por ejemplo, esencialmente ser monovalentes, bivalentes o trivalentes, puede ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos, etc., y pueden ser biparápticos (como se define en la presente y, por ejemplo, en el documento WO 2009/068625). Por ejemplo, un compuesto de la invención puede ser:

- (Esencialmente) monovalente, es decir, (esencialmente) que comprende un único aglutinante de TNF de la invención. Como se menciona, cuando se usa en formato monovalente, un aglutinante de TNF de la invención preferiblemente tiene una extensión X(n) C-terminal como se describe adicionalmente en el presente documento. Tal compuesto de la invención también puede tener una vida media extendida.

- (Esencialmente) bivalente o trivalente y monoespecífico. Tal compuesto de la invención comprenderá dos o más ISVD contra el TNF, que pueden ser iguales o diferentes y cuando diferentes pueden dirigirse contra el mismo epítipo en TNF o contra diferentes epítopes en TNF (en este último caso, para proporcionar un compuesto biparatopico o

multiparatopico de la invención). Tal compuesto de la invención también puede tener una vida media extendida.

- (Esencialmente) bivalente, trivalente (o multivalente) y biespecífico o triespecífico (o multiespecífico). Tal

5 compuesto de la invención se dirigirá contra el TNF y al menos otro objetivo. Como se describe en el presente documento, dicho otro objetivo puede ser, por ejemplo, otro objetivo terapéuticamente relevante (es decir, distinto de TNF) para proporcionar un compuesto de la invención que es

10 biespecífico con respecto al TNF y dicho otro objetivo terapéutico. Dicho otro objetivo también puede ser un objetivo que proporcione una vida media aumentada (tal como albúmina de suero humano), para proporcionar un compuesto de la invención que tenga una vida media aumentada. Como también

15 se menciona en este documento, dicho otro objetivo puede permitir también que el compuesto de la invención se dirija a células, tejidos u órganos específicos o puede permitir que el compuesto de la invención se internalice en una célula. También es posible combinar estos enfoques / ISVD, por

20 ejemplo para proporcionar un compuesto de la invención que es biespecífico para TNF y para al menos otro objetivo terapéuticamente relevante y que es de vida media extendida.

De nuevo, preferiblemente, cuando estos compuestos de la invención contienen uno o más ISVD distintos de al menos un

aglutinante de TNF de la invención, al menos uno y preferiblemente todos estos otros ISVD contendrán dentro de su secuencia una o más mutaciones de marco que reducen la unión por anticuerpos preexistentes (tales como, en particular, una combinación de residuos/ mutaciones de aminoácidos en las posiciones 11, 89, 110 o 112 que es como se describe en este documento para los aglutinantes de TNF de la invención o como se describe generalmente en WO2015/173325). Además, cuando tales compuestos de la invención tienen un aglutinante de TNF de la invención en su extremo C-terminal, entonces dicho aglutinante de TNF C-terminal (y como resultado, el compuesto de la invención) tendrá preferiblemente una extensión C-terminal X(n) como se describe en este documento. De forma similar, cuando tales compuestos de la invención tienen otro ISVD en su extremo C-terminal (es decir, no un aglutinante de TNF de la invención, sino por ejemplo un ISVD que se extiende durante la vida media), entonces dicho ISVD C-terminal (y como resultado, el compuesto de la invención) tendrá preferiblemente una extensión C-terminal X(n) como se describe aquí o contendrá dentro de su secuencia una o más mutaciones marco que reducen la unión por anticuerpos preexistentes (de nuevo, como se describe adicionalmente aquí y en WO2015/ 173325).

Como quedará claro para la persona experta, cuando un

compuesto de la invención se destina para uso tópico (por ejemplo, en la piel o en el ojo) o se entiende que tiene una acción terapéutica (localizada) en alguna parte, por ejemplo, en el tracto GI (gastrointestinal), por ejemplo, después de
5 la administración oral o por supositorio, o en los pulmones, por ejemplo, después de la administración por inhalación, o se aplica directamente al lugar de acción previsto (por ejemplo, por inyección directa), un compuesto de la invención generalmente no requerirá una extensión de vida media.

10 Además, para el tratamiento de ciertas afecciones o indicaciones agudas, puede ser preferible no tener una vida media prolongada. En estos casos, el uso de un compuesto monovalente de la invención o de un compuesto de la invención (que comprende el aglutinante de TNF) sin extensión de vida
15 media (por ejemplo, un compuesto de la invención que es bivalente o biparápito con respecto al TNF) se prefiere.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de tales compuestos de la invención se representan esquemáticamente en la Tabla C-1 a continuación, y cada uno
20 de estos forma un aspecto adicional de la invención. Otros ejemplos de compuestos adecuados de la invención sin extensión de vida media serán claros para el experto en la materia con base en la descripción en el presente documento. Como será evidente para el experto en la materia, cuando un

compuesto de la invención está destinado a la administración sistémica o para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno crónico, habitualmente será preferible que dicho compuesto de la invención haya aumentado su vida media (tal como se define en la presente memoria), es decir, en comparación con el aglutinante de TNF presente en dicho compuesto de la invención. Más preferiblemente, dicho compuesto de la invención contendrá una ISVD que se extiende en vida media, tal como, preferiblemente, una ISVD y en particular una unión de Nanocuerpo a la albúmina de suero humano (como se describe en este documento).

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de tales compuestos de la invención se representan esquemáticamente en la Tabla C-2 a continuación, y cada uno de estos forma un aspecto adicional de la invención. Otros ejemplos de compuestos adecuados de la invención con una vida media de extensión serán claros para el experto en la materia con base en la descripción en el presente documento. Generalmente, para los compuestos de la invención con extensión de vida media, se prefiere mucho la presencia de una extensión C-terminal.

Los Dominios Variables Individuales de Inmunoglobulina pueden usarse como un "bloque de constructos" para la preparación de un compuesto, tal como un polipéptido de la

invención, que opcionalmente puede contener uno o más "bloques de constructos" adicionales, tales como ISVD, contra el mismo u otro epítoto en TNF o contra uno o más antígenos, proteínas u objetivos diferentes a TNF, por ejemplo bloques

5 de constructos que tienen un modo de acción terapéutico.

Generalmente, los compuestos, polipéptidos o constructos que comprenden o consisten esencialmente en un solo bloque de constructos, Dominio Único Variable de Inmunoglobulina o único Nanocuerpo se denominarán aquí compuestos

10 "monovalentes" o polipéptidos "monovalentes" o como "constructos monovalentes", respectivamente. Compuestos, polipéptidos o constructos que comprenden dos o más bloques de constructos o unidades de unión (tales como, por ejemplo, ISVD) también se denominarán aquí compuestos, polipéptidos o

15 constructos "multivalentes", y los bloques de constructos/ISVD presentes en dichos compuestos, polipéptidos o los constructos también se denominarán aquí en un "formato multivalente". Por ejemplo, un compuesto o polipéptido "bivalente" puede comprender dos Dominios Variables

20 Individuales de Inmunoglobulina, opcionalmente unidos a través de una secuencia enlazadora, mientras que un compuesto o polipéptido "trivalente" puede comprender tres Dominios Variables Individuales de Inmunoglobulina, opcionalmente unidos a través de dos secuencias enlazadoras; mientras que

un compuesto o polipéptido "tetraivalente" puede comprender cuatro Dominios Variables Individuales de Inmunoglobulina, opcionalmente unidos a través de tres secuencias enlazadoras, etc.

- 5** En un compuesto multivalente, polipéptido o constructo, los dos o más ISVD, como los Nanocuerpos, pueden ser iguales o diferentes, y pueden dirigirse contra el mismo antígeno o determinante antigénico (por ejemplo, contra las mismas partes o epítopes) o contra diferentes partes o epítopes) o
- 10** alternativamente puede dirigirse contra diferentes antígenos o determinantes antigénicos; o cualquier combinación adecuada de los mismos. Compuestos, polipéptidos o constructos que contienen al menos dos bloques de constructos (tales como, por ejemplo, ISVD) en los que al menos un bloque de
- 15** constructos se dirige contra un primer antígeno (es decir, TNF) y al menos un bloque de constructos se dirige contra un segundo antígeno (es decir, diferente de TNF) también se denominarán compuestos, polipéptidos o constructos "multiespecíficos", respectivamente, y los bloques de
- 20** constructos (tales como, por ejemplo, ISVD) presentes en tales compuestos, polipéptidos o constructos también se denominarán aquí como en un "formato multiespecífico". Así, por ejemplo, un compuesto o polipéptido "biespecífico" de la invención es un compuesto o polipéptido que comprende al

menos un ISVD dirigido contra un primer antígeno (es decir, TNF) y al menos un ISVD adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de TNF), mientras que un compuesto o polipéptido "triespecífico" de la invención es un

5 compuesto o polipéptido que comprende al menos un ISVD dirigido contra un primer antígeno (es decir, TNF), al menos un ISVD adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de TNF) y al menos un ISVD adicional dirigido contra un tercer antígeno (es decir, diferente tanto

10 del TNF como del segundo antígeno); etc.

Los compuestos "multiparápícos", polipéptidos "multiparápícos" y constructos "multiparápícas", tales como, por ejemplo, compuestos "biparápícos", polipéptidos o constructos, o compuestos, polipéptidos o constructos

15 "triparápícos", comprenden o consisten esencialmente en dos o más bloques de constructos que cada tener un paratope diferente.

Por consiguiente, los ISVD de la invención que se unen a TNF pueden estar en forma esencialmente aislada (como se

20 define en este documento), o pueden formar parte de un compuesto, polipéptido o constructo, que puede comprender o constar esencialmente de uno o más ISVD que se unen a TNF y que opcionalmente puede comprender adicionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas enlazadas

opcionalmente a través de uno o más enlazadores adecuados).

La presente invención se refiere a un compuesto, polipéptido o constructo que comprende o consiste esencialmente en al menos un ISVD según la invención, tal como uno o más ISVD de

5 la invención (o fragmentos adecuados de los mismos), que se unen a TNF como se define en este documento.

El uno o más ISVD de la invención se pueden usar como una unidad de unión o un bloque de constructos en dicho compuesto, polipéptido o construcción, para proporcionar un

10 compuesto, polipéptido o construcción monovalente, multivalente o multiparápito de la invención, respectivamente, como descrito aquí. La presente invención

también se refiere a un compuesto o polipéptido que es monovalente que comprende o consiste esencialmente en un

15 polipéptido monovalente o ISVD de la invención. La presente invención también se refiere a un compuesto, polipéptido o constructo que es un compuesto multivalente, un polipéptido multivalente o un constructo multivalente, tal como, por

ejemplo, un compuesto, polipéptido o construcción bivalente o

20 trivalente que comprende o consiste esencialmente en dos o más ISVD de la invención (para compuestos o polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath et al. (J. Biol. Chem. 276:7346-7350, 2001), así como

al ejemplo del WO 96/34103, WO 99/23221 y WO 2010/115998).

La invención se refiere además a un compuesto o polipéptido multivalente (también denominado aquí "compuesto(s) multivalente(s) de la invención" y "polipéptido(s) multivalente(s) de la invención", respectivamente) que comprenden o (esencialmente) consisten en al menos un ISVD (o fragmentos adecuados del mismo) dirigidos contra el TNF, preferiblemente TNF humano, y un ISVD adicional.

En un aspecto, en su forma más simple, el compuesto, polipéptido o construcción multivalente de la invención es un compuesto, polipéptido o construcción bivalente de la invención que comprende un primer ISVD, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra el TNF, y un segundo ISVD idéntico, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra el TNF, en el que dicho primer y dicho segundo ISVD, tales como Nanocuerpos, pueden estar opcionalmente unidos mediante una secuencia enlazadora (como se define en la presente memoria).

En su forma más simple, un compuesto, polipéptido o construcción multivalente de la invención puede ser un compuesto, polipéptido o construcción trivalente de la invención, que comprende un primer ISVD, tal como Nanocuerpo, dirigido contra el TNF, un segundo ISVD idéntico, tal como Nanocuerpo, dirigido contra el TNF y una tercera ISVD

idéntica, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra el TNF, en el que dichas primera, segunda y tercera ISVD de inmunoglobulina, tales como Nanocuerpos, pueden unirse opcionalmente a través de una o más, y en particular dos, 5 secuencias de enlace.

En otro aspecto, el compuesto, polipéptido o construcción multivalente de la invención puede ser un compuesto, polipéptido o construcción biespecífico de la invención, que comprende un primer ISVD, tal como un 10 Nanocuerpo, dirigido contra el TNF, y un segundo ISVD, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra un segundo antígeno, en el que dicho primer y segundo ISVD, tales como Nanocuerpos, pueden estar opcionalmente unidos a través de una secuencia enlazadora (como se define en la presente memoria); mientras 15 que un compuesto multivalente, polipéptido o constructo de la invención también puede ser un compuesto, polipéptido o construcción trispecífico de la invención, que comprende un primer ISVD, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra el TNF, un segundo ISVD, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra un 20 segundo antígeno y un tercer ISVD, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra un tercer antígeno, en el que dicho primer, segundo y tercer ISVD, tales como Nanocuerpos, pueden estar opcionalmente unidos a través de una o más, y en particular dos, secuencias de enlace.

En un aspecto particular, el compuesto, polipéptido o construcción de la invención es un compuesto, polipéptido o construcción biespecífico trivalente, respectivamente. Un compuesto, polipéptido o constructo biespecífico trivalente de la invención en su forma más simple puede ser un compuesto, polipéptido o construcción trivalente de la invención (como se define en este documento), que comprende dos ISVD idénticos, tales como Nanocuerpos, contra el TNF y un tercer ISVD, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra otro antígeno, en el que dicho primer, segundo y tercer ISVD, tales como Nanocuerpos, pueden estar opcionalmente unidos a través de una o más, y en particular dos, secuencias de enlace.

En otro aspecto, el compuesto o polipéptido de la invención es un compuesto o polipéptido biespecífico. Un compuesto, polipéptido o constructo biespecífico de la invención en su forma más simple puede ser un compuesto bivalente, polipéptido o constructo de la invención (como se define en este documento), que comprende un ISVD, tal como un Nanocuerpo, contra el TNF y un segundo ISVD, tal como un Nanocuerpo, dirigido contra otro antígeno, en el que dicho primer y segundo ISVD, tales como Nanocuerpos, pueden unirse opcionalmente a través de una secuencia enlazadora.

En un aspecto preferido, el compuesto, polipéptido o

construcción multivalente de la invención comprende o consiste esencialmente en dos o más Dominios Variables Individuales de Inmunoglobulina dirigidos contra el TNF. En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto, 5 polipéptido o constructo que comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD de acuerdo con la invención, tales como 2, 3 o 4 ISVD (o fragmentos adecuados de los mismos), que se unen a TNF. Los dos o más ISVD se pueden unir opcionalmente a través de uno o más enlazadores 10 peptídicos.

En un aspecto preferido, el compuesto, polipéptido o construcción de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD, en donde dichos al menos dos ISVD pueden ser iguales o diferentes, pero de los cuales 15 al menos un ISVD está dirigido contra el TNF, tal como como vinculante TNF.

En un aspecto particular, el compuesto, polipéptido o construcción de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD, en donde al menos dos 20 ISVD se eligen independientemente del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8-41, 61-66 y 69.

Las afinidades relativas pueden depender de la ubicación de los ISVD en el compuesto, polipéptido o construcción resultante de la invención. Se apreciará que el orden de los

ISVD en un compuesto o polipéptido de la invención (orientación) puede elegirse de acuerdo con las necesidades de la persona experta en la técnica. El orden de los ISVD individuales así como si el compuesto o polipéptido comprende un enlazador es una cuestión de elección de diseño. Algunas orientaciones, con o sin enlazadores, pueden proporcionar características de unión preferidas en comparación con otras orientaciones. Por ejemplo, el orden de un primer ISVD (por ejemplo, ISVD 1) y un segundo ISVD (por ejemplo, ISVD 2) en el compuesto, polipéptido o construcción de la invención puede ser (desde N-terminal hasta C-terminal): (i) ISVD 1 (por ejemplo, Nanocuerpos 1)-[enlazador]-ISVD 2 (por ejemplo, Nanocuerpo 2); o (ii) ISVD 2 (por ejemplo, Nanocuerpo 2)-[enlazador]-ISVD 1 (por ejemplo, Nanocuerpo 1); (en el que el enlazador es opcional). Todas las orientaciones están abarcadas por la invención. Los compuestos, polipéptidos y constructos que contienen una orientación de ISVD que proporciona las características de unión deseadas se pueden identificar fácilmente mediante cribado de rutina.

En los compuestos o constructos de la invención, tales como los polipéptidos de la invención, los dos o más bloques de constructos, tales como por ejemplo, los ISVD, y opcionalmente uno o más de otros grupos, fármacos, agentes, residuos, residuos o unidades de unión pueden estar

directamente vinculados entre sí (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/23221) o pueden estar vinculados entre sí a través de uno o más espaciadores o enlazadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos.

5 Los espaciadores o enlazadores adecuados para uso en compuestos o polipéptidos multivalentes y multiespecíficos serán claros para la persona experta, y en general pueden ser cualquier engarce o espaciador usados en la técnica para unir secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, dicho enlazador o

10 espaciador es adecuado para uso en el constructo de compuestos, constructos, proteínas o polipéptidos que están destinados para uso farmacéutico.

En una realización, la invención se refiere a un compuesto o polipéptido como se define en la presente

15 memoria, en el que dichos ISVD están directamente unidos entre sí o están enlazados a través de un enlazador. En otra realización, la invención se refiere a un compuesto o polipéptido como se define en la presente memoria, en el que un primer ISVD o un segundo ISVD o posiblemente un tercer

20 ISVD o posiblemente una albúmina de suero de unión de ISVD se unen mediante un enlazador.

Algunos enlazadores y espaciadores particularmente preferidos incluyen los espaciadores y conectores que se usan en la técnica para unir fragmentos de anticuerpos o dominios

de anticuerpos. Estos incluyen los enlazadores mencionados en la técnica anterior general, así como por ejemplo los enlazadores que se usan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos de ScFv (a este respecto, sin embargo, debe observarse que, mientras que en diacuerpos y en ScFv fragmentos, la secuencia del enlazador utilizada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permitan que los dominios pertinentes VH y VL se unan para formar el sitio completo de unión al antígeno, no hay una limitación particular en la longitud o la flexibilidad del conector usado en el polipéptido de la invención, ya que cada ISVD, tal como un Nanocuerpo, forma por sí mismo un sitio completo de unión a antígeno).

Por ejemplo, un enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada, y en particular secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferiblemente entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos preferidos de tales secuencias de aminoácidos incluyen enlazadores Gly-Ser, por ejemplo del tipo $(gly_x ser_y)_z$, como (por ejemplo $(gly_4 ser)_3$ o $(gly_3 ser_2)_3$, como se describe en el WO 99/42077 y GS30, enlazadores GS15, GS9 y GS7 descritos en las aplicaciones de Ablynx mencionadas en este documento (véase, por ejemplo, WO 06/040153 y WO 06/122825), así como regiones bisagras, tales como las

regiones bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de forma natural o similares secuencias (tales como las descritas en el documento WO 94/04678). Los enlazadores preferidos se representan en la Tabla E, por ejemplo, en las

5 SEQ ID NO: 85-100.

Algunos otros enlazadores particularmente preferidos son poli-alanina (tal como AAA), así como los enlazadores GS30 (SEQ ID NO: 85 en WO 06/122825) y GS9 (SEQ ID NO: 84 en WO 06/122825).

10 En una realización, la invención se refiere a un compuesto como se define en la presente memoria, donde dicho enlazador se selecciona del grupo que consiste en enlazadores de 5GS, 7GS, 9GS, 10GS, 15GS, 18GS, 20GS, 25GS, 30GS, 35GS y 40GS.

15 Otros enlazadores adecuados generalmente comprenden compuestos orgánicos o polímeros, en particular los adecuados para uso en proteínas para uso farmacéutico. Por ejemplo, se han usado residuos de poli (etilenglicol) para unir dominios de anticuerpos, véase, por ejemplo, el documento WO
20 04/081026.

Está abarcado dentro del alcance de la invención que la longitud, el grado de flexibilidad u otras propiedades de los enlazadores utilizados (aunque no crítico, como suele ser para los enlazadores utilizados en fragmentos ScFv) pueden

tener alguna influencia sobre las propiedades del compuesto o constructo final de la invención, tal como el polipéptido de la invención, que incluyen, pero no se limitan a, la afinidad, especificidad o avidez por una quimioquina, o por uno o más de los otros antígenos. Con base en la descripción en este documento, la persona experta será capaz de determinar los enlazadores óptimos para usar en un compuesto o constructo específico de la invención, tal como el polipéptido de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Por ejemplo, en compuestos multivalentes o polipéptidos de la invención que comprenden bloques de constructos, tales como ISVD o Nanocuerpos dirigidos contra el TNF y otro objetivo, la longitud y flexibilidad del enlazador son preferiblemente tales que permiten cada bloque de constructos, tal como un ISVD, de la invención presente en el polipéptido para unirse a su objetivo análogo, por ejemplo el determinante antigénico en cada uno de los objetivos. De nuevo, con base en la descripción de la presente, la persona experta podrá determinar los enlazadores óptimos para usar en un compuesto o constructo específico de la invención, tal como un polipéptido de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos rutinarios limitados.

También está dentro del alcance de la invención que los

enlazadores usados confieren una o más propiedades o funcionalidades favorables a los compuestos o constructos de la invención, tales como los polipéptidos de la invención, o proporciona uno o más sitios para la formación de derivados o

5 para la unión de grupos funcionales (por ejemplo, como se describe en este documento para los derivados de los ISVD de la invención). Por ejemplo, los enlazadores que contienen uno o más residuos de aminoácidos cargados pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que los

10 enlazadores que forman o contienen epítopes o etiquetas pequeños pueden usarse para fines de detección, identificación o purificación. De nuevo, con base en la descripción en el presente documento, la persona experta podrá determinar los enlazadores óptimos para uso en un

15 compuesto, polipéptido o constructo específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Finalmente, cuando se usan dos o más enlazadores en los compuestos o constructos tales como polipéptidos de la

20 invención, estos enlazadores pueden ser iguales o diferentes.

De nuevo, con base en la descripción en este documento, la persona experta será capaz de determinar los enlazadores óptimos para uso en un compuesto o constructo o polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos

experimentos de rutina limitados.

Para una descripción general de compuestos y polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más Nanocuerpos y su preparación, también se hace
5 referencia a Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; así como, por ejemplo, a los documentos WO 1996/34103, WO 1999/23221, WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO
10 2009/068627.

La invención también se refiere a secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos y constructos descritos en este documento.
15 La invención además incluye constructos genéticas que incluyen las secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos anteriores y uno o más elementos para constructos genéticas conocidas per se. El constructo genética puede estar en forma de un plásmido o vector. De nuevo, tales constructos pueden
20 ser en general como se describe en las solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V., tales como por ejemplo WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

En un aspecto, la invención se refiere a un ácido

nucleico que codifica un ISVD, polipéptido, compuesto o constructo de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la
5 invención.

La invención también se refiere a huéspedes o células hospedadoras que contienen tales secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos, o que expresan (o son capaces de expresar), las secuencias de aminoácidos, aglutinantes de TNF,
10 polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos y constructos descritos en este documento. De nuevo, tales células hospedadoras pueden ser generalmente como se describe en las solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V., tales como por ejemplo WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079,
15 WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

En un aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora o huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención, o un vector de expresión de acuerdo con la invención.

20 La invención también se refiere a un método para preparar una secuencia de aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteína de fusión, compuestos o constructo como se describe en la presente memoria, método que comprende cultivar o mantener una célula huésped como se describe en la

presente en condiciones tales que dicha célula huésped produce o expresa una secuencia de aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteína de fusión, compuestos o constructos como se describe en este documento, y

5 opcionalmente además comprende aislar la secuencia de aminoácidos, los enlazadores de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos así producidos. De nuevo, tales métodos se pueden realizar como se describe en general en las solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V.,

10 tales como por ejemplo WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

En un aspecto particular, la invención se refiere a un método para producir un ISVD de acuerdo con la invención o un compuesto de acuerdo con la invención o un polipéptido de

15 acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) Expresar, en una célula hospedadora u organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico como se define aquí;

20 opcionalmente seguido de:

b) Aislar o purificar el ISVD de acuerdo con la invención, el compuesto de acuerdo con la invención o el polipéptido según la invención, respectivamente. La invención también se refiere a una composición que

comprende al menos una secuencia de aminoácidos, un aglutinante de TNF, un polipéptido, una proteína de fusión, un compuesto o un constructo como se describe en este documento.

- 5** La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una secuencia de aminoácidos, aglutinante de TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo como se describe en la presente memoria, y opcionalmente al menos un vehículo,
- 10** diluyente o excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente comprende uno o más polipéptidos o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Dichas preparaciones, vehículos, excipientes y diluyentes pueden generalmente ser como se describe en las solicitudes de
- 15** patente publicadas de Ablynx NV, tales como, por ejemplo, los documentos WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

- Cuando las secuencias de aminoácidos, los aglutinantes de TNF, los polipéptidos, las proteínas de fusión, los
- 20** compuestos o los constructos descritos en este documento tienen una vida media aumentada, se administran preferiblemente a la circulación. Como tales, pueden administrarse de cualquier manera adecuada que permita que las secuencias de aminoácidos, aglutinantes de TNF,

polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos entren en la circulación, tales como intravenosamente, mediante inyección o infusión, o de cualquier otra manera adecuada (incluyendo administración oral, administración

5 subcutánea, administración intramuscular, administración a través de la piel, administración intranasal, administración a través de los pulmones, etc.) que permite que las secuencias de aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos entren a la

10 circulación. Los métodos adecuados y las vías de administración serán evidentes para el experto, de nuevo, por ejemplo, también a partir de la enseñanza de las solicitudes de patente publicadas de Ablynx NV, tales como, por ejemplo, WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO.

15 2008/142164 o WO 2009/068627.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede prevenirse o tratarse mediante el uso de una secuencia de aminoácidos, un

20 aglutinante de TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o construir como se describe en la presente memoria, método que comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos, un aglutinante de TNF, polipéptido,

proteína de fusión, compuesto o constructo de la invención, o una composición farmacéutica que comprende lo mismo. Las enfermedades y trastornos que pueden prevenirse o tratarse mediante el uso de un polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo como se describe aquí generalmente serán los mismos que las enfermedades y trastornos que pueden prevenirse o tratarse mediante el uso del residuo terapéutico que está presente en el polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo de la invención. Particularmente, la presente invención se refiere a un compuesto, composición, constructo, polipéptido, aglutinante de TNF o ISVD como se describe en este documento para uso como medicamento.

En el contexto de la presente invención, el término "prevención o tratamiento" no solo comprende prevenir o tratar la enfermedad, sino que también comprende generalmente prevenir la aparición de la enfermedad, ralentizar o revertir el avance de la enfermedad, prevenir o ralentizar la aparición de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir o aliviar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir la gravedad o la duración de la enfermedad o cualquier síntoma asociado con ella o prevenir una aumento adicional de la gravedad de la enfermedad o de cualquier síntoma asociado a la misma, prevención, reducción o reversión de cualquier daño fisiológico causado por la

enfermedad, y generalmente cualquier acción farmacológica que sea beneficiosa para el paciente que se está tratando. Una composición de la invención no necesita efectuar un curado completo, o erradicar cada síntoma o manifestación de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable.

Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado de enfermedad dado, pero no es necesario que eliminen todas las manifestaciones de la enfermedad para que se consideren como agentes terapéuticos útiles. De forma similar, un tratamiento administrado profilácticamente no necesita ser completamente eficaz para prevenir la aparición de una afección a fin de constituir un agente profiláctico viable. Simplemente reduciendo el impacto de una enfermedad (por ejemplo, al reducir el número o la gravedad de sus síntomas, o aumentando la efectividad de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o reduciendo la probabilidad de que la enfermedad ocurra o empeore en un sujeto, es suficiente.

En una realización, una indicación de que se ha administrado al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición es una mejora sostenida sobre el valor inicial de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular. Las composiciones farmacéuticas de la presente

invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un ISVD, compuesto o polipéptido de la presente invención formulado junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por una "cantidad

5 terapéuticamente efectiva" de un ISVD, compuesto o polipéptido de la invención se entiende una cantidad de la composición que confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado, a una relación beneficio / riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto

10 terapéutico es suficiente para "tratar" al paciente según se usa ese término en este documento.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición, constructo, compuesto, aglutinante de TNF, ISVD o polipéptido como se describe en este documento, para

15 uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno del tracto digestivo.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición, constructo, compuesto, aglutinante de TNF, ISVD o polipéptido como se describe en la presente memoria,

20 donde dicha enfermedad o trastorno del tracto digestivo es enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, mucositis, estomatitis aftosa, enfermedad celíaca, traumatismo en el tracto digestivo y cáncer en el tracto

digestivo.

Los pacientes con síndrome de intestino irritable han alterado la permeabilidad intestinal a pesar de tener pocos o ningún cambio histológico detectable en el intestino (Dunlop
5 Am J Gastroenterol. 2006 Junio; 101 (6):1288-94). Los pacientes con enfermedad celíaca han alterado la permeabilidad intestinal y el daño característico de las vellosidades del intestino delgado que se distingue de la EII. Se cree que la enfermedad inflamatoria del intestino es
10 el resultado de una respuesta inmune desregulada iniciada por interacciones microbiano-huésped. El sistema inmune responde a bacterias comensales no patógenas que generan inflamación crónica. De manera similar, en la enterocolitis necrotizante, un sistema inmune subdesarrollado estresado genera una
15 respuesta inapropiada a las bacterias intestinales normales, induciendo una forma de colitis potencialmente mortal (Jilling et al, 2006, J Immunol, 177, 3273-82).

El sujeto a ser tratado puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero en particular es un mamífero, y más en
20 particular un ser humano. Como será evidente para el experto en la materia, el sujeto a tratar será en particular una persona que padece, o está en riesgo de, las enfermedades y trastornos mencionados en este documento.

En otra realización, la invención se refiere a un método

para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, cuyo método comprende administrar, a un sujeto que padece o está en riesgo de las enfermedades y trastornos mencionados en este documento, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos, aglutinante de TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo de la invención, o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

La secuencia de aminoácidos, el aglutinante de TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo o las composiciones que los comprenden se administran de acuerdo con un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir o tratar la enfermedad o trastorno a prevenir o tratar. El clínico generalmente podrá determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o trastorno a prevenir o tratar, la gravedad de la enfermedad a tratar o la gravedad de los síntomas de la misma, el aminoácido específico secuencia, aglutinante de TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo de la invención a usar, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica a usar, la edad, género, peso, dieta, estado general del paciente y factores similares bien conocidos por el clínico.

Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la

administración de una o más secuencias de aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la invención, o de una o más composiciones que comprenden los mismos, en una o más

5 cantidades farmacéuticamente eficaces o dosis El médico puede determinar la cantidad específica o dosis a administrar, de nuevo con base en los factores citados anteriormente.

En general, para la prevención o el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en este documento y

10 dependiendo de la enfermedad o trastorno específico a tratar, la potencia o la vida media de las proteínas de fusión o constructos específicas que se utilizarán, la específica vía de administración y la formulación o composición farmacéutica específica utilizada, las secuencias de aminoácidos,

15 aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la invención generalmente se administrarán en una cantidad entre 1 gramo y 0.01 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, preferiblemente entre 0.1 gramos y 0.1 microgramos por

20 kilogramo de peso corporal por día, tal como aproximadamente 1, 10, 100 o 1000 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, ya sea continuamente (por ejemplo, por infusión), como una sola dosis diaria o como múltiples dosis divididas durante el día. El clínico generalmente podrá determinar una

dosis diaria adecuada, dependiendo de los factores mencionados en este documento. También quedará claro que, en casos específicos, el médico puede optar por desviarse de estas cantidades, por ejemplo, sobre la base de los factores citados anteriormente y su juicio experto. Generalmente, puede obtenerse alguna orientación sobre las cantidades a administrar a partir de las cantidades habitualmente administradas para anticuerpos o fragmentos de anticuerpos convencionales comparables contra el mismo blanco administrado esencialmente por la misma ruta, teniendo en cuenta las diferencias en afinidad/ avidéz, eficacia, biodistribución, vida media y factores similares bien conocidos por la persona experta.

Usualmente, en el método anterior, se usará una única secuencia de aminoácidos, un aglutinante de TNF, un polipéptido, una proteína de fusión, un compuesto o un constructo de la invención. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención usar dos o más secuencias de aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la invención en combinación.

Las secuencias de aminoácidos, el aglutinante de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la invención también se pueden usar en combinación con uno

o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como un régimen de tratamiento combinado, que puede o no conducir a un efecto sinérgico. De nuevo, el clínico podrá seleccionar tales compuestos o
5 principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basado en los factores citados anteriormente y su juicio experto.

En particular, las secuencias de aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión,
10 compuestos o constructos de la invención pueden usarse en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos que son o pueden usarse para la prevención o el tratamiento de las enfermedades y trastornos que pueden prevenirse o tratarse con las secuencias de
15 aminoácidos, aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la invención, y como resultado de los cuales puede obtenerse o no un efecto sinérgico.

La eficacia del régimen de tratamiento utilizado de
20 acuerdo con la invención se puede determinar o seguir de cualquier manera conocida per se para la enfermedad o trastorno implicado, como será evidente para el médico. El clínico también podrá, cuando corresponda y caso por caso, cambiar o modificar un régimen de tratamiento en particular,

a fin de lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir los efectos secundarios indeseados, o para lograr un equilibrio apropiado entre lograr el efecto terapéutico deseado por una parte y evitar, limitar o reducir los efectos secundarios indeseados por otra parte.

En general, se seguirá el régimen de tratamiento hasta que se logre el efecto terapéutico deseado o mientras se mantenga el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede ser determinado por el médico.

Como las secuencias de aminoácidos, los aglutinantes de TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la invención son capaces de unirse al TNF, pueden usarse, en particular, para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos que pueden ser tratados por otros agentes biológicos fármacos (como anticuerpos, por ejemplo Adalimumab/ HUMIRA™ o Infliximab/ REMICADE™) que son capaces de unirse al TNF o modular el TNF. Dichas enfermedades y trastornos serán evidentes para la persona experta. Los aglutinantes de TNF de la invención pueden usarse en particular para la prevención y el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en los documentos WO 2004/041862 y WO 2006/122786.

Como se menciona, un aspecto específico de la invención se refiere a los aglutinantes de TNF de la invención que

están en formato monovalente. Estos aglutinantes de TNF monovalentes de la invención son particularmente adecuados para aplicaciones tópicas (que incluyen aplicaciones en la piel, en el tracto GI o los pulmones) o para administración

5 tópica (por ejemplo En la piel), administración oral (por ejemplo, en el tracto GI), administración por supositorio (de nuevo, por ejemplo, en el tracto GI) o administración a los pulmones (por ejemplo, mediante inhalación). Como tales, pueden usarse para la prevención o tratamiento de

10 enfermedades y trastornos de la piel, pulmones o tracto gastrointestinal que pueden prevenirse o tratarse mediante la aplicación de un inhibidor de TNF en la piel, los pulmones o el tracto gastrointestinal, respectivamente (tales como enfermedades inflamatorias o autoinmunes que afectan la piel,

15 los pulmones o el tracto gastrointestinal, respectivamente).

En una realización, la presente invención se refiere a una composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD como se describe aquí, en donde la composición, el compuesto, el constructo, el aglutinante de

20 TNF, el polipéptido o el ISVD se administra tópicamente a la tracto digestivo.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD como se describe aquí, en donde la

composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía oral en una forma de dosificación adecuada para administración oral al tracto gastrointestinal (GI).

5 En una realización, la presente invención se refiere a una composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD como se describe aquí, en donde la composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD se administra en una forma de dosificación
10 para administración oral al tracto GI en el que la forma de dosificación se selecciona de tabletas, cápsulas, píldoras en polvo, gránulos, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires.

 En una realización, la presente invención se refiere a
15 una composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD como se describe en la presente memoria, donde la composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía rectal para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del tracto
20 digestivo.

 En una realización, la presente invención se refiere a una composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD como se describe en la presente memoria, donde la composición, compuesto, constructo, aglutinante de

TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía rectal en una forma de dosificación para administración rectal, preferiblemente seleccionado entre supositorios y enemas.

En una realización, la presente invención se refiere también a una composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD como se describe en la presente memoria, donde la composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía parenteral mediante inyección subcutánea, inyección intracutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intralesional o técnicas de infusión.

Algunos ejemplos específicos pero no limitantes de tales enfermedades y trastornos son enfermedades o trastornos del tracto GI, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la enfermedad de Crohn, el síndrome del intestino irritable, la colitis ulcerosa, la mucositis, la estomatitis aftosa, la enfermedad celíaca, el traumatismo del tracto digestivo o cánceres en el tracto digestivo. Como se mencionó, cuando se usan para estos fines, los aglutinantes de TNF monovalentes de la invención preferiblemente tienen una mutación D (o E1D) en la posición 1 y una extensión C-terminal (tal como una alanina C-terminal) y los aglutinantes de TNF de las SEQ. ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41, 62-63, y 65-66 en particular las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64 y 69, más

particularmente las SEQ ID NO: 40, son ejemplos preferidos de aglutinantes de TNF de la invención que son particularmente adecuados para estos fines.

De este modo, en un aspecto adicional, la invención se
5 refiere a un aglutinante de TNF de la invención (como se describe en la presente memoria) que está esencialmente en formato monovalente (y preferiblemente como una mutación D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como C-terminal alanina) para su uso en la prevención y tratamiento
10 de enfermedades y trastornos de la piel, pulmones o tracto GI, y en particular en la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes que afectan la piel, los pulmones o el tracto GI. Dicho aglutinante de TNF se elige preferiblemente del grupo que consiste en las SEQ ID
15 NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41, 62-63 y 65-66, en particular las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64 y 69, más particularmente las SEQ ID NO: 40.

La invención también se refiere a un aglutinante de TNF de la invención (como se describe en este documento) que está
20 esencialmente en formato monovalente (y preferiblemente como una mutación D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) para uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades o trastornos del tracto GI, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII),

la enfermedad de Crohn, el síndrome del intestino irritable, la colitis ulcerosa, la mucositis, la estomatitis aftosa, la enfermedad celíaca, el tracto digestivo o el cáncer tracto digestivo, en particular EII y enfermedad de Crohn. De nuevo, **5** dicho aglutinante de TNF se elige preferiblemente del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41, 62-63 y 65-68, en particular las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64 y 69, más particularmente SEQ ID NO: 40.

La invención también se refiere a una composición **10** farmacéutica que está destinada (o adecuada para) aplicación tópica en la piel, administración por inhalación u otra administración a los pulmones, o administración oral, administración rectal u otra administración al tracto GI, que comprende un aglutinante de TNF de la invención que **15** esencialmente está en formato monovalente (y que preferiblemente como una mutación D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal). De nuevo, dicho aglutinante de TNF se elige preferiblemente del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, **20** 38, 41, 62-63 y 65-68, en particular las SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64 y 69, más particularmente las SEQ ID NO: 40.

La invención también se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno de la piel, cuyo método comprende aplicar a la piel de un sujeto

que necesita dicho tratamiento un aglutinante de TNF de la invención que esencialmente está en formato monovalente (y esa preferiblemente como una mutación D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) o

5 una composición que comprende dicho aglutinante de TNF monovalente.

La invención también se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno de la piel, cuyo método comprende administrar (por ejemplo, por

10 inhalación) a los pulmones de un sujeto que necesita dicho tratamiento un aglutinante de TNF de la invención que esencialmente es en formato monovalente (y preferiblemente como una mutación D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) o una composición que

15 comprende dicho aglutinante de TNF monovalente.

La invención también se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos del tracto GI tales como enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable,

20 colitis ulcerosa, mucositis, estomatitis aftosa, enfermedad celíaca, traumatismo del tracto digestivo o cánceres del tracto digestivo, en particular EII o enfermedad de Crohn, cuyo método comprende administrar (por ejemplo, administración oral o rectal) al tracto GI de un sujeto que

necesita dicho tratamiento un aglutinante de TNF de la invención que esencialmente es en formato monovalente (y preferiblemente como una mutación D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) o una
5 composición que comprende dicho aglutinante de TNF monovalente.

Como se mencionó anteriormente, en sitios de inflamación la barrera de la mucosa del tracto digestivo a menudo se ve comprometida, por lo que las proteínas administradas por vía
10 oral pueden entrar en los tejidos intestinales y la circulación sistémica. En una realización, la invención también se refiere a una composición, compuesto, constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD como se describe en la presente memoria, donde la composición, compuesto,
15 constructo, aglutinante de TNF, polipéptido o ISVD alcanza los tejidos intestinales y la circulación sistémica de un paciente.

Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención quedarán claros a partir de la descripción
20 adicional en este documento.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes aspectos, Ejemplos y Figuras preferidos, no limitativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5	Figura 1	Es una tabla que enumera algunas de las posiciones de aminoácidos que se mencionarán específicamente en este documento y su numeración de acuerdo con algunos sistemas de numeración alternativos (tales como Aho e IMGT).
10	Figura 2	Muestra un alineamiento de las SEQ ID NO: 1, 59 y 58.
	Figura 3	Enumera las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en este documento.
15	Figura 4	Muestra un alineamiento de las SEQ ID NO: 1, 8 a 41 y 58.
	Figura 5	Muestra un alineamiento de las SEQ ID NO: 1, 31 y 36 a 41.
20	Figura 6	Muestra dos gráficos correspondientes de puntos de datos obtenidos en el Ejemplo 1 cuando se analizaron 96 muestras de suero (66 de sujetos sanos humanos y 30 de pacientes con LES) para unirse a las siguientes SEQ ID NO: 58

(con mutación Q108L), Referencia A, Referencia A (referencia L11V, V89L)-Ala, Referencia A (L11V, A74S, V89L)-Ala y Referencia A (L11V, S49A, V89L)-Ala. Cada punto representa el nivel de unión para una de las 96 muestras analizadas. Los puntos de datos que se muestran en el panel derecho y en el panel izquierdo son los mismos; en el panel de la derecha, los puntos de datos medidos con cada muestra individual para cada uno de los compuestos probados (es decir, las SEQ ID NO: 58 (Q108L), Referencia A, Referencia A (L11V, V89L)-A, Referencia A (L11V, A74S) , V89L)-A y Referencia A (L11V, S49A, V89L)-A) están conectados por medio de una línea (como resultado, la declinación de la línea da una indicación del grado en que la unión por anticuerpos preexistentes es reducido cuando se introducen las mutaciones de la invención y la alanina C-terminal).

- Figura 7
5 Es una tabla que enumera los datos de enlace (5 columnas que dan niveles de enlace PreAb normalizados (RU a 125 segundos) y 4 columnas que dan porcentaje de reducción en enlace PreAb en comparación con la Referencia A de los puntos de datos compilados en la Figura 6.
- Figura 8 (A)
10 Muestra la Predicción ("P") y Experimental ("E") de sitios de escisión de tripsina y quimotripsina basados en la secuencia A016600015.
- Figura 8 (B)
15 Muestra el Análisis A016600015 en gel de SDS PAGE teñido con azul de Coomassie.
- Figura 8 (C)
Muestra el resultado ejemplar de un análisis de digestión triptica mediante RPC LC-MS de la secuencia A016600015.
- Figura 9
20 Es una representación esquemática del modelo SHIME.
- Figura 10
Muestra las FACS de competición en células HEK293 H-mTNF tratadas con Enbrel (EC30=0.02 nm, panel A) y Enbrel

(EC90=0.2 nm, panel B), IRR000027=

Nanocuerpo irrelevante.

Figura 11

5

Muestra los resultados de expresión de A016600021, A016600039 y A016600040 en un gel NuPage Bis-Tris al 12% en condiciones no reductoras, se aplicaron 5 µl de muestra. Los carriles son los siguientes: (1) A016600021; (2) A016600039; (3) A016600040; (4)

10

Comparador irrelevante; (5) Comparador irrelevante; (6) Estándar de proteína Precision Plus (BioRad); (7) Estándar 0.5 µg; (8) Estándar de 1.0 µg; (9) Estándar de 2.5 µg.

15 Ejemplos

20

Los inventores de la presente se propusieron optimizar la secuencia de aminoácidos ("Optimización de la secuencia") de los quelantes de TNF. En este caso, los aglutinantes de TNF están destinados a la administración oral, por lo que los aglutinantes de TNF deberían ser preferiblemente estables a proteasas. Además, en el proceso de optimización de secuencia también se pretende (1) humanizar los aglutinantes de TNF; (2) eliminar epítopes potenciales de anticuerpos preexistentes; así como (3) eliminar sitios para

modificaciones postraduccionales (PTM). Al mismo tiempo, estas características deberían ponerse en conformidad con las características funcionales de los aglutinantes de TNF, es decir, inhibir el TNF- α , que preferiblemente debería ser
5 aproximadamente el mismo o incluso mejorarse.

Ejemplo 1: Producción de Nanocuerpos en Pichia Pastoris y Purificación A Través de la Unión de Proteína A

Las células de Pichia pastoris X33 que contenían los constructos de Nanocuerpo anti-TNF- α se hicieron crecer
10 (30°C, 250 rpm) en placas de 24 pocillos (24 ml) en un tampón de citrato BGCM. Después de dos días, el medio se cambió a un tampón que contenía metanol (citrato de BMCM) para inducir la expresión. Metanol fresco se añadió regularmente para compensar el consumo de metanol y la evaporación, y el medio
15 se cosechó después de dos días. Los Nanocuerpos se purificaron mediante la captura en columna de proteína A (Poros) o MEP Hypercel (Pall) seguido de elución en tampón de Glicina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los Nanocuerpos se desalaron posteriormente hacia PBS usando una
20 columna de Zebaspín de 2 ml (Pierce). Las fracciones se concentraron utilizando columnas de VivaSpin (MWCO 5000, PES). Las concentraciones de las fracciones de Nanocuerpo se midieron usando Trinean Dropsense. La concentración se basó en la medición OD280 con normalización para los valores

OD340. La pureza y la integridad de los Nanocuerpos se verificaron mediante SDS-PAGE y análisis MS usando un sistema de HPLC de Fase Reversa acoplado a un espectrómetro de masas ESI-Q-TOF (Q-TOF Ultimate (Waters)).

5 Ejemplo 2: Humanización

Las secuencias de proteína de los aglutinantes de TNF de la presente invención finalmente se recuperaron de las llamas y son parcialmente distintas de los anticuerpos homólogos que se producen naturalmente en humanos. Por lo tanto, estos

10 aglutinantes de TNF son potencialmente inmunogénicos cuando se administran a pacientes humanos.

Generalmente, para fines de humanización, las secuencias de Nanocuerpos se hacen más homólogas a la secuencia de consenso de la línea germinal humana. Con la excepción de los

15 residuos de Nanocuerpos "distintivos", aminoácidos específicos en las regiones marco que difieren entre el Nanocuerpo y una secuencia consenso de la línea germinal humana se alteran a la contraparte humana de tal manera que la estructura de la proteína, la actividad y la estabilidad

20 se mantienen preferiblemente intactas.

En este caso, después de una alineación con la base de datos del gen V de la línea germinal humana, se identificó que DP51 tenía la homología más alta como la de la SEQ ID NO: 58. Todas las permutaciones posibles se elaboraron con vistas

a alterar la secuencia parental de Nanocuerpo más acorde con la línea germinal DP51 humana secuencia consenso, mientras se mantienen intactas las otras características del Nanocuerpo intactas o estas características se mejoran incluso.

5 Finalmente, se introdujeron un total de 12 residuos de aminoácidos en las SEQ ID NO: 58: 1E, 14P, 27F, 29F, 40A, 49S, 73N, 75K, 78L, 82aN, 83R y 108L. Notablemente, Q27F y S29F son parte de CDR1, pero no afectaron a la unión (véase la SEQ ID NO: 1; datos no mostrados).

10 **Ejemplo 3: Reducción de la Unión de Anticuerpos Preexistentes**

3.1 Parte Experimental

Las muestras humanas utilizadas en el Ejemplo 3.2 a continuación se obtuvieron de fuentes comerciales o de voluntarios humanos (después de obtener todos los
15 consentimientos y aprobaciones necesarios) y se utilizaron de acuerdo con los requisitos legales y reglamentarios aplicables (incluidos, entre otros, los relativos al secreto médico) y privacidad del paciente).

En el Ejemplo 3.2 siguiente, a menos que se indique
20 explícitamente lo contrario, la unión de anticuerpos preexistentes que están presentes en las muestras usadas (es decir, de voluntarios sanos, pacientes con artritis reumatoide (AR) y pacientes con LES) a los Nanocuerpos probados se determinó usando ProteOn de la siguiente manera:

Los Nanocuerpos se capturaron en albúmina de suero o mediante un marcaje FLAG3 usando anti-FLAG M2 monoclonal.

En el caso de la unión de anticuerpos preexistentes en Nanocuerpos capturados en albúmina de suero humano (HSA) se evaluó usando ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se usó PBS/ Tween (solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4, Tween20 al 0.005%) como tampón de ejecución y los experimentos se realizaron a 25°C. Los carriles de enlazadores de un Chip de sensor ProteOn GLC se activaron con EDC/NHS (velocidad de flujo 30µl/min) y HSA se inyectó a 10µg/ml en tampón ProteOn Acetato pH4.5 (caudal 100µl/min) para rendir niveles de inmovilización de aproximadamente 3200 RU. Después de la inmovilización, las superficies se desactivaron con etanolamina HCl (velocidad de flujo 30 µl/min). Los Nanocuerpos se inyectaron durante 2 minutos a 45 µl/min sobre la superficie de HSA para producir un nivel de captura de Nanocuerpos de aproximadamente 200 RU. Las muestras que contenían anticuerpos preexistentes se centrifugaron durante 2 minutos a 14,000 rpm y el sobrenadante se diluyó 1:10 en PBS-Tween20 (0.005%) antes de inyectarse durante 2 minutos a 45 µl/min seguido de una etapa de disociación posterior de 400 segundos. Después de cada ciclo (es decir, antes de una nueva etapa de captura de nanocuerpo e inyección de sangre), las superficies de HSA se

regeneraron con una inyección de HCl de 2 minutos (100 mm) a 45 µl/min. El procesamiento de Sensorgram y el análisis de datos se realizaron con ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los sensogramas que muestran la unión de anticuerpos preexistentes se obtuvieron después de la doble referencia restando 1) disociación Nanocuerpo-HSA y 2) unión no específica a la vía del ligando de referencia. Los niveles de unión de anticuerpos preexistentes se determinaron estableciendo puntos de informe a los 125 segundos (5 segundos después del final de la asociación). El porcentaje de reducción en la unión de anticuerpos preexistentes se calculó con relación a los niveles de unión a 125 segundos de un Nanocuerpo de referencia.

3.2 La Introducción de las Mutaciones de la Invención en la Referencia A (SEQ ID NO: 1) Conduce a Una Reducción en la Unión por Anticuerpos Preexistentes.

Se usaron las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 58 (con mutación Q108L), Referencia A, Referencia A (L11V, V89L)-Ala, Referencia A (L11V, A74S, V89L)-Ala y Referencia A (L11V, S49A, V89L)-Ala, todos con un marcaje HIS6-FLAG3 N-terminal (SEQ ID NO: 42). Estos Nanocuerpos se probaron para la unión por anticuerpos preexistentes que están presentes en las muestras de 96 muestras de suero de voluntarios humanos sanos. Los compuestos se capturaron

usando la etiqueta FLAG y se midió la unión usando ProteOn de acuerdo con el protocolo dado en el preámbulo de esta Parte Experimental.

Los resultados se muestran en la Figura 6. La Figura 7
5 enumera los resultados para cada una de las muestras que forman uno de los puntos de datos en la Figura 6.

Se puede observar que para la mayoría de las 96 muestras analizadas, la introducción de las mutaciones según la invención conduce a una reducción en la unión de anticuerpos
10 preexistente, dependiendo en general del grado de reducción de los anticuerpos preexistentes en la presente invención. cada muestra era capaz de unirse a la Referencia A.

Ejemplo 4: Evaluación de la Estabilidad Química

La estabilidad química de los diversos Nanocuerpos
15 humanizados u optimizados se evaluó mediante pruebas de esfuerzo de oxidación y temperatura forzada.

Se preparó un nuevo compuesto de referencia, es decir, A016600015 (SEQ ID NO: 61). Este nuevo compuesto de referencia se ajusta más a presuntos candidatos clínicos y,
20 por lo tanto, permite una mejor evaluación del impacto de las mutaciones. A016600015 es idéntica a la Referencia A (SEQ ID NO: 1) excepto por una alanina C-terminal y un aspartato en el residuo de aminoácido 1. La Ala C-terminal se introdujo a la vista de la reducción de las PEA de acuerdo con el

documento WO 2012/175741 (cf. Ejemplo 3). El Glutamato N-terminal se sustituyó por un Aspartato en el residuo de aminoácido 1 después de una evaluación de la formación de piroglutamato. La actividad de la nueva Referencia A016600015 era virtualmente idéntica a la Referencia A (datos no mostrados). Este nuevo compuesto A016600015 se usa adicionalmente en todos los ejemplos como el compuesto de Referencia A menos que se indique lo contrario.

Con base en los resultados del Ejemplo 3, se introdujeron mutaciones anti-PEA L11V y V89L (entre otros) en comparación con el nuevo compuesto de Referencia A016600015, dando como resultado A016600018 (SEQ ID NO: 37) y A016600019 (SEQ ID NO: 38). Las secuencias se representan en la Figura 3.

4.1 Estabilidad de la Oxidación Forzada

Se sometieron muestras de Nanocuerpos del compuesto de Referencia A016600015 (1 mg/ml) durante cuatro horas a temperatura ambiente y en oscuridad a H₂O₂ 10 mM en PBS, en paralelo con muestras de control sin H₂O₂, seguido de cambio de tampón a PBS usando columnas Zeba de desalinización (0.5 ml) (Thermo Scientific). Las muestras sometidas a estrés y de control se analizaron después por medio de RPC en una máquina de la Serie 1200 o 1290 (Agilent Technologies) sobre una columna Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies) a 70°C. La

oxidación de los Nanocuerpos se cuantificó mediante la determinación del % de área de pico de pre-picos que se producen como resultado del estrés oxidativo, en comparación con el pico de proteína principal.

- 5 No se observaron variantes en las muestras sometidas a estrés por oxidación del compuesto de Referencia A016600015 (datos no mostrados).

4.2 Estabilidad de la Tensión por Temperatura

- Se almacenaron muestras de Nanocuerpos (1-2 mg/ml) en PBS
 10 durante cuatro semanas a -20°C (control negativo) 25 y 40°C. Después de este período de incubación, los Nanocuerpos se digirieron con tripsina o LysC. Los péptidos de las muestras sometidas a estrés y control se analizaron después por medio de RPC en una máquina de la Serie 1290 (Agilent Technologies)
 15 sobre una columna Acquity UPLC BEH300-C18 (Agilent Technologies) a 60°C. La columna está acoplada a un espectrómetro de masas Q-TOF (6530 Mass Q-TOF preciso (Agilent)). La integración del mapa de péptido UV 214 nm o cromatogramas de cromatografía de ionización (Cromatograma de
 20 iones extraídos) permite la cuantificación confiable de una modificación dada.

Solo a 40°C se observaron algunas variantes de isomerización y piro-glutamato. Notablemente, el residuo de aminoácido 54D, que se localiza en la CDR2 expuesta

ambientalmente y potencialmente susceptible de isomerización, prácticamente no demostró isomerización. La isomerización del residuo de aminoácido 1 fue inapreciable si los Nanocuerpos se mantuvieron a 25°C o por debajo de ellos durante períodos

5 de tiempo prolongados.

4.3 Temperaturas de Fusión Vía Ensayo de Cambio Térmico (TSA)

La temperatura de fusión de un Nanocuerpo es una medida de su estabilidad biofísica.

Las temperaturas de fusión de diversos Nanocuerpos se

10 evaluaron mediante un ensayo de cambio térmico (TSA) esencialmente según Ericsson et al. 2006 (Aals of Biochemistry, 357:289-298). En resumen, se incubaron 5 µl de Nanocuerpos monovalentes purificados (800 µg/ml) con 5 µl de la sonda fluorescente Sypro Orange (Invitrogen, S6551)

15 (concentración final 10x) en 10 µl de tampón (fosfato 100 mM, borato 100 mM), Citrato 100 mM, NaCl 115 mM, tamponado a diferentes pH que varían de 3.5 a 9). Las muestras se calentaron en una máquina LightCycler 480II (Roche), de 37°C a 99°C a una velocidad de 4.4°C/s, después de lo cual se

20 enfriaron a 37°C a una velocidad de 0.03°C/s. Tras el despliegue inducido por calor, se exponen parches hidrófobos de las proteínas a los que se une el Naranja Sypro, dando como resultado un aumento en la intensidad de fluorescencia (Ex/Em = 465/580 nm). El punto de inflexión de la primera

derivada de la curva de intensidad de fluorescencia sirve como una medida de la temperatura de fusión (T_m).

El compuesto de Referencia A016600015 (SEQ ID NO: 61) se comparó con A016600018 (SEQ ID NO: 37) y A016600019 (SEQ ID NO: 38). A diferencia de A016600015, tanto A016600018 como A016600019 comprenden las mutaciones anti-PEA L11V y V89L de acuerdo con el Ejemplo 3. Los resultados a continuación:

Tabla 4.3

ID NB	anti-PEA	Cantidad (μ g)	T_m ($^{\circ}$ C) pH7
A016600015	-	87	59
A016600018	L11V V89L	38	59
A016600019	L11V V89L	16	56

Como puede verse en la Tabla 4.3, las mutaciones anti-PEA parecían no tener ningún efecto sobre la T_m (A016600018) o un efecto negativo sobre la T_m (A016600019). Notablemente, la diferencia entre A016600018 ("00018") y A016600019 ("00019") es 78L y 78V, respectivamente. En general, se demostró que cualquier efecto de esta diferencia en el residuo de aminoácido 78 es insignificante en comparación con la introducción de las mutaciones anti-PEA (véase también más adelante).

Al producir, también se observó que la expresión de estas variantes que comprenden las mutaciones anti-PEA no era

óptima. Esto se cuantificó adicionalmente usando el método del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 4.3.

De hecho, la cantidad recuperable de ambas variantes que comprenden las mutaciones anti-PEA fue de aproximadamente 2 veces menor (A016600018) o incluso 4 veces menor (A016600019) que las del Nanocuerpo de referencia. Esto fue una completa sorpresa para los inventores, ya que la introducción de estas mutaciones anti-PEA L11V y V89L no dio como resultado una caída tan grave en la capacidad de recuperar Nanocuerpos antes como se determinó para cualquier otro clon.

4.4 Estabilidad de la Proteasa

Se pretende que los inhibidores de TNF eventualmente puedan administrarse por vía oral. Sin embargo, el estómago y los intestinos constituyen un ambiente naturalmente hostil ya que están diseñados para la descomposición enzimática y la absorción de alimentos parcialmente sólidos. En general, la proteólisis de un sustrato proteico solo puede ocurrir si 8-10 residuos de aminoácidos dentro de la cadena polipeptídica pueden unirse y adaptarse a la estereoquímica específica del sitio activo de la proteasa (Fontana et. al, 2004 Acta Biochim Pol, 51, 299-321), por lo tanto, la susceptibilidad a la escisión enzimática depende en gran medida de las propiedades físicas del sustrato.

Con el fin de identificar posibles sitios de degradación

de proteasa y diseñar variantes más estables, los presentes inventores se propusieron identificar los sitios de escisión de tripsina y quimotripsina de acuerdo con métodos estándar.

Los sitios de proteasa predichos ("P") de SEQ ID NO: 58 y el nuevo compuesto de Referencia A016600015 ("00015") se representan como ("X") en la Figura 8A tanto para tripsina como para quimotripsina.

A partir de esta figura, ya se puede concluir que:

- La CDR3 comprende 9 posibles sitios de escisión de proteasas.

- La mutación de humanización Q75K (VH3-DP51) introdujo un sitio potencial de escisión de tripsina.

- La mutación de humanización K73N (VH3-DP51) eliminó un posible sitio de escisión de tripsina.

- Las mutaciones anti-PEA L11V y V89L fueron neutrales a este respecto, es decir, estas mutaciones no introdujeron o eliminaron posibles sitios de escisión de proteasa, como se esperaba.

Con el fin de evaluar los sitios predichos de escisión de proteasa en un entorno más in vivo, los Nanocuerpos se digirieron con tripsina y quimotripsina. En particular, se incubaron Nanocuerpos anti-TNF α en soluciones al 10% de tripsina o α -quimotripsina. Se introdujeron dos μ g de Nanocuerpo en digesto triptico durante 2 h, 4 h y durante la

noche a 37°C, o digestión quimiotrífica durante 2 h, 4 h o toda la noche a 25°C. La reacción proteolítica se detuvo mediante la adición del TFA (0.1% final). Las mezclas de reacción se analizaron mediante RPC LC-MS o se separaron en un gel SDS PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Usando ImageQuant (GE) la cantidad de material intacto se calculó y normalizó a 0 h como punto de tiempo de referencia.

Un resultado ejemplar de una digestión triptica en un gel SDS PAGE teñido con azul de Coomassie se proporciona en la Figura 8B. Un resultado ejemplar de un análisis de digestión triptica a través de RPC LC-MS se proporciona en la Figura 8C. Los sitios de escisión confirmados experimentalmente ("E") se representan en la Figura 8A como tripsina ("E") y quimotripsina ("E").

De la Figura 8A, está claro que se reduce el número de sitios de escisión reales. Sin embargo, quedan varios sitios de reconocimiento triptico y quimiotrítico.

Para optimizar la resistencia a la tripsina, se seleccionaron 5 posiciones para diseñar una variante optimizada: R38, K64, S94, P95 y R96, lo que dio como resultado la variante A016600013; SEQ ID NO: 65.

Sin embargo, la mutación de estos sitios dio como resultado niveles de expresión reducidos y acumulación intracelular de la variante (A016600013; SEQ ID NO: 65). De

hecho, cuando el residuo de aminoácido 38 volvió a mutarse, lo que mejoró la expresión, la variante resultante (A016600014; SEQ ID NO: 66) fue completamente contraria a las expectativas más sensible a proteasas que el compuesto de Referencia A016600015 (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió no mutar estas posiciones en el compuesto de referencia y Nanocuerpos en estudio, es decir, A016600018 y A016600019. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente Tabla 4.4.

10 Tabla 4.4

			% Nanocuerpos intactos después de la incubación (horas) con proteasas							
			Tripsina				Quimotripsina			
Nanocuerpo	L11	V89	0h	2h	4h	0N	0h	2h	4h	0N
A016600015	.	.	100	95	99	79	100	16	18	15
A016600019	V	L	100	83	91	78	100	27	39	31
A016600018	V	L	100	89	85	63	100	38	31	14

Ejemplo 5: Estabilidad en Fluidos Intestinales Derivados de un Modelo SHIME

Para investigar la estabilidad de la anti-TNF Nanocuerpos en el tracto GI humano, los Nanocuerpos se incubaron en 5 fluidos diferentes derivados de un SHIME (Simulador de

Intestinal Humano Ecosistema Microbiano), representando el tracto gastrointestinal humano (GI). El modelo SHIME es un modelo dinámico científicamente validado del tracto gastrointestinal completo, que se utiliza para estudiar

5 parámetros fisicoquímicos, enzimáticos y microbianos en el tracto gastrointestinal en un entorno controlado in vitro.

El modelo SHIME consta de cinco reactores que simulan secuencialmente el estómago (condiciones ácidas y digestión con pepsina), intestino delgado (procesos digestivos) y las 3

10 regiones del intestino grueso, es decir, el ascendente ("A"), transversal ("T") y colon descendente ("D") (procesos microbianos). El control cuidadoso de los parámetros ambientales en estos reactores permitió comunidades microbianas complejas y estables que son muy similares en

15 estructura y función a la comunidad microbiana en las diferentes regiones del colon humano (ver Figura 9). Todos los fluidos GI fueron proporcionados por ProDigest (Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, Bélgica). Los Nanocuerpos anti-TNF se probaron durante un período máximo de

20 39 horas en los fluidos gastrointestinales. Después de la incubación en los fluidos GI, se determinó la estabilidad de los Nanocuerpos mediante pruebas de funcionalidad en un ELISA de competición. Los Nanocuerpos se probaron a una concentración fija de 100 µg/ml a 37°C en 5 fluidos GI

diferentes en el modelo SHIME. En diferentes puntos temporales se tomaron muestras y se almacenaron a -20°C con o sin la adición de inhibidores de la proteasa, de acuerdo con el cronograma de la Tabla 5.1. Las muestras se transfirieron a placas de ELISA revestidas y posteriormente se analizaron en el ELISA de competición. En resumen, A016600015 se revistió a una concentración de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ en PBS. Después del bloqueo, se añadió una concentración fija de biot-hTNF α 0,3 nm junto con una serie de titulación de las variantes en los diferentes fluidos GI. La detección se realizó con extravidina-HR, por ejemplo.

Tabla 5.1 Programa de Incubación

Fluido	Puntos Temporales
SI ayunado	0, 1, 2, 4, 6, 8h*
SI alimentado	0, 1, 2, 4, 6, 8h*
Colon A	0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24h
Colon T	0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24, 39h
Colon D	0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24, 32h
PBS	0, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 20, 24, 32h

*Después de la incubación, adición de 1mg/ml de Pefabloc y $1\text{ }\mu\text{M}$ de Pepstatina (inhibidores de la proteasa).

Un resultado ejemplar en el Colon "T" se muestra en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2

		0h	1h	2h	4h	8h	15h	20h	24h	39h
0001 5	IC50	7.3E-10	5.0E-10	6.4E-10	6.2E-10	9.7E-10	1.3E-09	1.9E-09	2.8E-09	2.0E-08
	relación	1.00	0.69	0.88	0.85	1.34	1.72	2.56	3.88	27.41
	%	100%	145%	113%	117%	75%	58%	39%	26%	4%
0001 8	IC50	5.7E-10	5.5E-10	6.9E-10	1.2E-09	2.8E-09	9.5E-09	3.2E-08	4.2E-08	6.2E-07
	relación	1.00	0.97	1.22	2.19	4.96	16.68	55.58	73.79	1097.18
	%	100%	103%	82%	46%	20%	6%	2%	1%	0%
0001 9	IC50	5.0E-10	4.7E-10	4.5E-10	9.1E-10	7.2E-10	1.7E-09	3.0E-09	5.2E-09	4.1E-08
	relación	1.00	0.93	0.89	1.81	1.43	3.36	6.02	10.32	82.22
	%	100%	108%	112%	55%	70%	30%	17%	10%	1%

Con base en los resultados con fluidos derivados de los diferentes compartimentos SHIME, la evaluación de estabilidad permite una clasificación de los Nanocuerpos que representa la estabilidad en todos los compartimentos GI: 00015> 00019> 00018.

Colectivamente, la eliminación de los sitios de escisión de la proteasa parece no tener ningún efecto positivo, como la estabilidad y la sensibilidad a la proteasa de esta familia de Nanocuerpos. La introducción de mutaciones anti-PEA L11V y V89L en A16600015 parece tener un efecto negativo en la estabilidad de este Nanocuerpo en particular.

Ejemplo 6: Variantes Estabilizadas

Dado que la eliminación de los sitios de escisión de proteasa no dio como resultado los resultados anticipados, los inventores establecieron variantes elaboradas de anti-TNF- α ,

que serían inherentemente más estables pero en las que las mutaciones de humanización y anti-PEA preferiblemente no estaban comprometidas. Esto requirió un enfoque no convencional a la vista de diversos residuos de aminoácidos que presentan características mutuamente excluyentes, tales como la humanización frente a la estabilidad de la proteasa frente a la afinidad.

6.1 Enlace de Cisteína Interno y Eliminación del Sitio de Escisión de la Quimotripsina CDR3

10 Localizado en CDR3 y potencialmente afectando las propiedades de unión, se decidió no obstante construir una variante en la que el residuo de aminoácido Y100d, que es un sitio de escisión de quimotripsina, se eliminó mediante una sustitución Y100dL (A016600046 100dL; SEQ ID NO: 62). La
15 variante A016600045 (SEQ ID NO: 69) se diseñó para evaluar el impacto de la tirosina en la posición 100d de CDR3 adicionalmente.

Además, los inventores plantearon la hipótesis de que podrían diseñarse variantes que serían inherentemente
20 estables mediante la introducción de un enlace disulfuro intradominio (véase, por ejemplo, Wozniak-Knopp y col., 2012 PLoS One. 2012; 7 (1):e30083). Esto requeriría la introducción de dos residuos de cisteínas que luego deberían aparearse para formar una cistina. Después de resolver la

estructura proteica del Nanocuerpo y su interacción con el TNF- α diana mediante estudios de cristalización (datos no mostrados), los inventores decidieron mutar las mutaciones de los aminoácidos S49C y I69C para introducir un enlace

5 disulfuro intradominio, aunque el residuo de aminoácido S49 es adyacente a CDR2, y se introdujo a la vista de los propósitos de humanización (que corresponden a la línea germinal humana DP51, ver el Ejemplo 2). La nueva variante que comprende S49C, I69C y Y100dL tiene la anotación

10 A016600052 (SEQ ID NO: 63).

Con el fin de evaluar la influencia de la posición de aminoácido 49 en profundidad, este residuo de aminoácido se mutó a una alanina. Notablemente, esta mutación en la posición 49 correspondería a la línea germinal humana IgHV3-

15 IgHJ, aunque diferente. Todas las nuevas variantes A016600046 (SEQ ID NO: 62), A016600016 (SEQ ID NO: 36), A016600020 (SEQ ID NO: 39) y A016600021 (SEQ ID NO: 40) comprenden A49.

Además, en la variante A016600020 (SEQ ID NO: 39) se evaluaron las posiciones D60A, E61D y P62S en vista de la

20 estabilidad física. Los residuos de aminoácidos A60, D61 y S62 están situados adyacentes al sitio Y58 de corte de quimotripsina confirmado experimentalmente y dentro del CDR2 según Kabat, lo que implica un alto riesgo de pérdida de potencia.

Además, un sitio de escisión de proteasa fue introducido accidentalmente por la mutación humanizadora Q75K. Sin estar ligados a ninguna teoría, los inventores hipotetizaron que cambiar el residuo de aminoácido A74S adyacente afectaría

5 potencialmente tanto a la humanización como a la sensibilidad de proteasa, pero solo hasta cierto punto, es decir, se esperaba que tanto la humanización como la sensibilidad a proteasa disminuyesen. a un grado aceptable. Las variantes que comprenden S74 son A016600016 ("00016"), A016600020

10 ("00020"), A016600021 ("00021"), A016600046 ("00046") y A016600052 ("00052") (SEQ ID NO: 36, 39, 40, 62 y 63, respectivamente). La variante comparativa era A016600038 ("00038"; SEQ ID NO: 64), que es idéntica a A016600021 (SEQ ID NO: 40), pero con 74S en lugar de 74A.

15 Las secuencias resultantes se proporcionan en la Figura 3.

6.2 Características de las Variantes Estabilizadas

A continuación, se evaluaron estas variantes para diversas características, esencialmente como se establece en los

20 Ejemplos 3 y 4.

En primera instancia, se determinó la producción de las variantes 00016, 00020 y 00021 en, por ejemplo, *pastoris*, de acuerdo con el Ejemplo 1. A continuación, los resultados.

Tabla 6.2A

Nanocuerpo	L11	S4 9	D6 0	E6 1	P6 2	A7 4	L78	V8 9	Cant idad (µg)	Tm a pH7 (°C)	Estabilida d en fluido GI (clasifica ción)
A016600021	V	A	.	.	.	S	V	L	332	65	1
A016600016	V	A	.	.	.	S	.	L	499	65	2
A016600020	V	A	A	D	S	S	V	L	374	75	3

A partir de estos resultados, puede verse que estas mutaciones dieron como resultado un aumento en la producción de más de 4-5 veces la producción del compuesto de referencia, que produjo 87 µg (véase el Ejemplo 4.3), o incluso más de 20-30 en las variantes relacionadas 00018 y 00019.

A continuación, la estabilidad térmica de estas variantes se determinó de acuerdo con el Ejemplo 4.3. Un resumen de los resultados obtenidos también se proporciona en la Tabla 6.2A.

No solo la producción aumentó drásticamente, sino también la estabilidad térmica aumentó inesperadamente con 5°C-16°C en comparación con el compuesto de referencia, pero incluso hasta 16-19°C en comparación con las variantes más estrechamente relacionadas 00018 y 00019.

Inesperadamente, el residuo de aminoácido A49 evita la influencia de los residuos de aminoácidos anti-PEA V11 y L89

sobre la producción y la estabilidad.

Varias variantes del Ejemplo 6.1 se evaluaron juntas en los fluidos GI derivados del modelo SHIME de acuerdo con el Ejemplo 5.

5 En la Tabla 6.2B se proporciona un resumen de la actividad resultante al final del período de incubación bajo diversas condiciones de A016600021, A016600038, A016600046 y A016600052. La incubación en PBS confirmó la estabilidad inherente de los Nanocuerpos (datos no mostrados).

10 **Tabla 6.2B**

	C/C0 vs tiempo en h							
	CD colon A	CD colon D	CD colon T	SI ayunado*	SI alimen tado*	UC2 colon A	UC2 colon D	UC2 colon T
A016600021	66	58	76	65	31	86	57	71
A016600038	48	41	47	60	33	77	50	59
A016600046	47	29	62	52	24	92	59	≥100
A016600052	41	49	40	ND	ND	64	43	55
A016600039	38	26	39	23	20	78	20	55
A016600040	38	40	19	67	24	91	83	63
A016600045	85	≥100	49	60	26	68	41	≥100

*Enfermo; ND no está determinado; CD es la enfermedad de Crohn; UC es colitis ulcerosa.

15 Las variantes A016600046 Y100dL (SEQ ID NO: 62) en las que se eliminó un sitio de escisión de proteasas y la variante A016600052 (SEQ ID NO: 63), que se estabilizó adicionalmente a través de un enlace de cisteína intradominio no proporcionaron ninguna mejora a este respecto.

20 Notablemente, la CI50 de las variantes 00046 y 00052 aumentó 2-5 veces en comparación con 00021 (1.13 nm y 3.56

nm, respectivamente en comparación con 0.67 nm) debido a la mutación en CDR3.

Los resultados de SHIME esencialmente confirmaron y extendieron los resultados de la T_m y la producción. Además,
 5 el modelo SHIME reveló que la variante 00021 (SEQ ID NO: 40) es consistentemente más estable que la variante A016600040 ("00040"; SEQ ID NO: 67) y la variante 00038 (SEQ ID NO: 64), que es indicativa de la contribución positiva de la Serina en la posición 74.

10 Notablemente, la variante A016600039 (SEQ ID NO: 68) que es idéntica a la variante 00040 (SEQ ID NO: 67) pero para A74S, mostró que S74 era consistentemente menos estable que A74 en el modelo SHIME.

Con base en todos los resultados, incluidos los
 15 resultados con fluidos derivados de los diferentes compartimentos SHIME, una evaluación de estabilidad global permite una clasificación de los Nanocuerpos que representa la estabilidad en todos los compartimentos GI: 00021> 00016> 00020> 00040> 00015> 00019> 00018.

20 Por lo tanto, las mutaciones anti-PEA L11V y V89L en A16600015 parecen tener un efecto negativo en la estabilidad de este Nanocuerpo en particular, que podría ser aliviado por 49A, pero no por 49C-69C. Además, en Nanocuerpos que comprenden mutaciones anti-PEA L11V y V89L, el residuo de

aminoácido 74S fue beneficioso para la estabilidad en el modelo SHIME.

6.3 A016600021 Tiene Características Favorables (Sobre A016600039 y A016600040)

- 5 Para la administración oral, se cree que puede ser necesaria una dosificación elevada junto a la estabilidad. Para tener costos aceptables, el candidato se produce preferiblemente en altas cantidades, se purifica sin pérdida considerable y se formula a alta concentración. Por lo tanto, los inventores
- 10 establecen experimentos para probar estos parámetros. Primero, los inventores se propusieron comparar los niveles de expresión A016600039 y A016600040 con A016600021.

- Como puede verse en la Figura 11A, la expresión de A016600039 (SEQ ID NO: 68) fue considerablemente menor que
- 15 los niveles de expresión de A01660021 (SEQ ID NO: 40) y A016600040 (SEQ ID NO: 67). Estos resultados también se cuantificaron a través de AKTAmicro, cuyos resultados se muestran en la Tabla 6.3

Tabla 6.3

Clon	Rendimiento Akta μ (g/l medio libre de células)
A016600021	6.3
A016600039	0.49
A016600040	2.3

20

Con respecto a la capacidad de fabricación de A016600021

frente a A016600040, se probaron ambos sobre la solubilidad máxima durante la concentración del caldo de fermentación. La solubilidad máxima en el caldo de fermentación clarificado es de solo 30 g/l para A016600040 (frente a >75 g/l para A016600021). Además, se encontraron pérdidas importantes durante la purificación adicional de A016600040.

Por lo tanto, además de la estabilidad, A016600021 también tiene características de producción y purificación inesperadamente favorables sobre A016600039 y A016600040.

Con base en las características ventajosas de estabilidad, expresión y purificación, los inventores se centraron en A016600021, cuya solubilidad se determinó. Para sorpresa completa de los inventores, A016600021 era soluble a una concentración sin precedentes de 200 mg/ml en H₂O.

Ejemplo 7: Las Variantes Estabilizadas Superan a los Puntos de Referencia

Se evaluaron las variantes A016600021 (SEQ ID NO: 40), A016600038 (SEQ ID NO: 64) y A016600045 (SEQ ID NO: 69) para la unión a TNF humano unido a una membrana (mTNF) en un ensayo de competición con Enbrel (Etanercept), un agente terapéutico anti-TNF basado en TNF-R2. A continuación, se generó una línea celular que expresaba establemente una forma no escindible de TNF humano por transfección de células HEK293H con un vector de expresión eucariota que codifica la

variante TNF R77T / S78T humana (denominada HEK293H-mTNF), como se describió previamente (Harashima et al. 2001 J Immunol 166:130-136). Después de la selección por coexpresión del gen de resistencia a la puomicina, la clasificación de las células que expresan mTNF individuales se realizó mediante FACS (BD FACS Aria) después de la tinción de las células con Remicade (Infliximab) y anticuerpo secundario de cabra F(ab')₂ IgG antihumana, ratón ads-PE. La expresión constitutiva del TNF unido a la membrana en los clones individuales seleccionados se confirmó mediante citometría de flujo (FACS Gama BD).

En primera instancia, se evaluó la unión de Enbrel a mTNF en estas células. Se sembraron 5,105 células de un único clon HEK293H-mTNF en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron directamente con diferentes concentraciones de Enbrel diluido en tampón FACS (PBS suplementado con 10% de FBS y 0.05% de azida sódica) durante 90 minutos a 4°C. Las células se lavaron con tampón FACS y se tiñeron con anticuerpo secundario de cabra F(ab')₂ IgG antihumana, ratón ads-PE, durante 30 minutos a 4°C. Después del lavado y la incubación de las células en tampón FACS en presencia de la mancha muerta de Yoduro TO-PRO-3, la unión de Enbrel a mTNF en células HEK293H-mTNF viables se midió mediante lectura en FACS Gama BD. A partir de la curva de respuesta a la dosis

obtenida, los valores EC30 y EC90 de Enbrel para la unión a mTNF se definieron como respectivamente de 0.02 nM y 0.2 nM.

Ambas concentraciones se aplicaron posteriormente en el ensayo de competición con Nanocuerpos dirigidos a TNF.

5 Para evaluar la unión de mTNF de A016600021, A016600038 y A016600045, se configuró un experimento de competición con Enbrel a concentraciones fijas de EC30 y EC90. Se comparó la potencia de los Nanocuerpos anti-TNF con el compuesto de referencia Cimzia (certolizumab pegol). Además, se incluyó un

10 Nanocuerpo irrelevante (IRR00027) como control negativo. En este ensayo, se aplicaron condiciones idénticas a las descritas anteriormente para la unión de Enbrel, excepto en la primera etapa de incubación que en este experimento implica el co-tratamiento de las células con una

15 concentración fija de Enbrel (EC30 o EC90) en combinación con diferentes concentraciones de Nanocuerpos anti-TNF o Cimzia que van desde 300nM a 12.5pM. Lectura en FACS Gama BD determinada unión de Enbrel en células HEK293H-mTNF que se redujo claramente después del co-tratamiento con

20 concentraciones crecientes de Nanocuerpos así como con Cimzia que indica la competencia de los agentes anti-TNF con Enbrel para la unión a mTNF. Los valores de IC50 de los agentes anti-TNF se determinaron como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7

	Enbrel (EC30: 0.02nm)	Enbrel (EC90: 0.2nm)
A016600021	0.43nm	0.65nm
A016600038	0.43nm	0.70nm
A016600045	0.54nm	0.76nm
Cimzia	7.9nm	4.8nm

Los resultados obtenidos demuestran que A016600021, A016600038 y A016600045 tienen una potencia 6-7 veces mejor que Cimzia a EC90 y una impresionante potencia 15-18 veces mejor que Cimzia a EC30. Las variantes estabilizadas tienen una potencia comparable para competir con Enbrel por la unión de mTNF.

En un FACS de competición se demostró que los Nanocuerpos también podían inhibir completamente la unión de Enbrel a mTNF. Esto sería indicativo de una idoneidad superior como medicamento para aplicación oral. En contraste, altas concentraciones de Cimzia dieron como resultado solo un bloqueo parcial de la unión de Enbrel (Figura 10).

Los contenidos completos de todas las referencias (incluyendo referencias bibliográficas, patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas y solicitudes de patentes en tramitación) citados a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente aquí como referencia, en particular para la enseñanza a la que se hace Referencia Anteriormente.

Tabla A: Referencia A y sus CDR y PMP6C11

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
58	NC55TNF-NC7 (PMP6C11) . WO06/122786: SEQ ID NO: 125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGK GREFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQNTVYLQMDSL KPEDTAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
59	WO2015/173325 SEQ ID NO: 345	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGK GREFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSS
1	Referencia A:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGK GREFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSS
2	CDR1 (Kabat)	TADMG
3	CDR2 (Kabat)	RISGIDGTTYDEPVKG
4	CDR3 (Kabat/ AbM)	PRYADQWSAYDY
5	CDR1 (AbM)	GFTFSTADMG
6	CDR2 (AbM)	RISGIDGTTY
7	CDR3 (Kabat/ AbM)	PRYADQWSAYDY
Nota: La SEQ ID NO: 4 es idéntica a la SEQ ID NO: 7		

Tabla B: Posibles Combinaciones de Aminoácidos en las Posiciones 11, 89, 110 y 112.

	POSICIÓN					POSICIÓN			
	11	89	110	112		11	89	110	112
C O M B I N A C I Ó N	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	C O M B I N A C I Ó N	V	T	T	S
	L	T	T	K		V	T	T	K
	L	T	T	Q		V	T	T	Q
	L	T	K	S		V	T	K	S
	L	T	Q	S		V	T	Q	S
	L	V	T	K		V	V	T	K
	L	V	T	Q		V	V	T	Q
	L	V	K	S		V	V	K	S
	L	V	Q	S		V	V	Q	S
						<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>
	L	L	T	K		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>K</u>
	L	L	T	Q		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>
	L	L	K	S		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>S</u>
	L	L	Q	S		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>

Tabla B-1: Posibles Combinaciones de Aminoácidos en las Posiciones 11, 89, 110, 112, 49 y 74

POSICIÓN 5						
C O M B I N A C I Ó N	11	89	110	112	49	74
	L	T	T	S	A	S
	L	T	T	K	A	S
	L	T	T	Q	A	S
	L	T	K	S	A	S
	L	T	Q	S	A	S
	L	V	T	K	A	S
	L	V	T	Q	A	S
	L	V	K	S	A	S
	L	V	Q	S	A	S
	L	L	T	K	A	S
	L	L	T	Q	A	S
	L	L	K	S	A	S
	L	L	Q	S	A	S

POSICIÓN					
C O M B I N A C I Ó N	11	89	110	112	49
	L	T	T	S	A
	L	T	T	K	A
	L	T	T	Q	A
	L	T	K	S	A
	L	T	Q	S	A
	L	V	T	K	A
	L	V	T	Q	A
	L	V	K	S	A
	L	V	Q	S	A
	L	L	T	K	A
	L	L	T	Q	A
	L	L	K	S	A
	L	L	Q	S	A

POSICIÓN					
C O M B I N A C I Ó N	11	89	110	112	74
	L	T	T	S	S
	L	T	T	K	S
	L	T	T	Q	S
	L	T	K	S	S
	L	T	Q	S	S
	L	V	T	K	S
	L	V	T	Q	S
	L	V	K	S	S
	L	V	Q	S	S
	L	L	T	K	S
	L	L	T	Q	S
	L	L	K	S	S
	L	L	Q	S	S

Tabla B-2: Posibles Combinaciones de Aminoácidos en las Posiciones 11, 89, 110, 112, 49 y 74

POSICIÓN						
C O M B I N A C I Ó N	11	89	110	112	49	74
	V	T	T	S	A	S
	V	T	T	K	A	S
	V	T	T	Q	A	S
	V	T	K	S	A	S
	V	V	T	K	A	S
	V	V	T	Q	A	S
	V	V	K	S	A	S
	V	V	Q	S	A	S
	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>S</u>
	V	L	T	K	A	S
	V	L	T	Q	A	S
	V	L	K	S	A	S
	V	L	Q	S	A	S

POSICIÓN					
C O M B I N A C I Ó N	11	89	110	112	49
	V	T	T	S	A
	V	T	T	K	A
	V	T	T	Q	A
	V	T	K	S	A
	V	V	T	K	A
	V	V	T	Q	A
	V	V	K	S	A
	V	V	Q	S	A
	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>A</u>
	V	L	T	K	A
	V	L	T	Q	A
	V	L	K	S	A
	V	L	Q	S	A

POSICIÓN					
C O M B I N A C I Ó N	11	89	110	112	74
	V	T	T	S	S
	V	T	T	K	S
	V	T	T	Q	S
	V	T	K	S	S
	V	V	T	K	S
	V	V	T	Q	S
	V	V	K	S	S
	V	V	Q	S	S
	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>
	V	L	T	K	S
	V	L	T	Q	S
	V	L	K	S	S
	V	L	Q	S	S

Tabla C-1: Representación Esquemática de Algunos Componentes de la Invención Sin Una Vida Media de ISVD Extendida.

<i>[Aglutinante TNF de la invención]</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-X(n)</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[Aglutinante TNF de la invención]</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[Aglutinante TNF de la invención]-X(n)</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[TNF2]</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[TNF2]-X(n)</i>
<i>[TNF2]-[Aglutinante TNF de la invención]</i>
<i>[TNF2]- [Aglutinante TNF de la invención]-X(n)</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[Unidad de orientación]</i>
<i>[Unidad de orientación]-[Aglutinante TNF de la invención]-</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[Unidad de orientación]-X(n)</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[Aglutinante TNF de la invención]-[Unidad de orientación]-X(n)</i>
Leyenda: - “[Aglutinante TNF de la invención]” representa el Aglutinante TNF de la invención. - “-” representa un enlace covalente directo o un enlazador adecuado, como un enlazador 9GS, 15GS o 35GS. - “X(n)” representa una extensión C-terminal como se define en el presente documento, tal como un único residuo de alanina. - “[TNF2]” representa un dominio de unión o unidad de unión (y en particular ISVD) frente a un TNF diferente del aglutinante de TNF de la invención. - “[Unidad de orientación]” representa un dominio de unión o unidad de unión (y en particular ISVD) que dirige el compuesto de la invención a una célula, tejido u órgano específicos.

Tabla C-2: Representación Esquemática de Algunos Componentes de la Invención Sin Una vida Media de ISVD Extendida.

<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]</i>
<i>[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-X(n)</i>
<i>[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]-X(n)</i>
<i>[[Aglutinante TNF de la invención]-[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]</i>
<i>[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]-[Aglutinante TNF de la invención]</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-X(n)</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]-[X(n)]</i>
<i>[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]-[Aglutinante TNF de la invención]-X(n)</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[TNF2]-[HLE]</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-[TNF2]</i>
<i>[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]-[TNF2]</i>
<i>[HLE]-[TNF2]-[TNF binder of the invention]</i>
<i>[TNF2]-[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]</i>
<i>[TNF2]-[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]-[</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[TNF2]-[HLE]-X(n)</i>
<i>[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-[TNF2]-X(n)</i>
<i>[HLE]-[Aglutinante TNF de la invención]-[TNF2]-X(n)</i>
<i>[HLE]-[TNF2]-[Aglutinante TNF de la invención]-X(n)</i>
<i>[TNF2]-[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-X(n)</i>

[TNF2]-[HLE]- [Aglutinante TNF de la invención]-X(n)
[Aglutinante TNF de la invención]-[Unidad de orientación]-[HLE]
[Unidad de orientación]-[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]
[Aglutinante TNF de la invención]-[Unidad de orientación]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[Unidad de orientación]-[Aglutinante TNF de la invención]-[HLE]-X(n)
Leyenda: - "[Aglutinante TNF de la invención]" representa el Aglutinante TNF de la invención. - "-" representa un enlace covalente directo o un enlazador adecuado, como un enlazador 9GS, 15GS o 35GS. - "X(n)" representa una extensión C-terminal como se define en el presente documento, tal como un único residuo de alanina. - "[HLE]" representa un dominio de unión o una unidad de unión con vida media extendida (y en particular un ISVD con vida media extendida), tal como una albúmina de suero (humana) de ISVD (y en particular un Nanocuerpo). - "[TNF2]" representa un dominio de unión o unidad de unión (y en particular ISVD) frente a un TNF diferente del aglutinante de TNF de la invención. - "[Unidad de orientación]" representa un dominio de unión o unidad de unión (y en particular ISVD) que dirige el compuesto de la invención a una célula, tejido u órgano específicos.

Tabla D: Secuencias de ISVD que se Unen a Albúmina de Suero

("ID" se refiere a SEQ ID NO como se usa en este documento)

Nombre	ID	Secuencia de Aminoácidos
Alb8	70	EVQLVESGGGLVQP ^{GS} NSLR ^{LS} CAASGFTFS ^S FGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN ^{AK} TTLYLQMNSLRP ^{ED} TAVY YCTIGGSLSRSSQGT ^{LV} TVSS
Alb23	71	EVQLLES ^{GS} GGGLVQP ^{GS} SLR ^{LS} CAASGFTFR ^S FGMSWVRQAPGKGPEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN ^{SK} NTLYLQMNSLRP ^{ED} TAVY YCTIGGSLSRSSQGT ^{LV} TVSS

Alb129	72	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Alb132	73	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTATY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Alb11	74	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb11 (S112K) -A	75	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTTLVKVSSA
Alb82	76	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb82-A	77	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Alb82- AA	78	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSAA
Alb82- AAA	79	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSAAA
Alb82-G	80	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSG
Alb82- GG	81	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGG
Alb82- GGG	82	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGG
Alb92	83	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY

		YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb223	84	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA

Tabla E: Varias Secuencias de Aminoácidos

("ID" se refiere al SEQ ID NO, como se usa en este documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Vinculador 5GS	85	GGGGS
Vinculador 7GS	86	SGGSGGS
Vinculador 8GS	87	GGGGCGGGS
Vinculador 9GS	88	GGGSGGGGS
Vinculador 10GS	89	GGGSGGGGS
Vinculador 15GS	90	GGGSGGGSGGGGS
Vinculador 18GS	91	GGGSGGGSGGGGGGS
Vinculador 20GS	92	GGGSGGGSGGGSGGGGS
Vinculador 25GS	93	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Vinculador 30GS	94	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Vinculador 35GS	95	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Vinculador 40GS	96	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGS
Articulación G1	97	EPKSCDKTHTCPPCP
Articulación 9GS-G1	98	GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
Región de articulación Llama larga superior	99	EPKTPKPQAAA
Articulación G3	100	ELKTPPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP