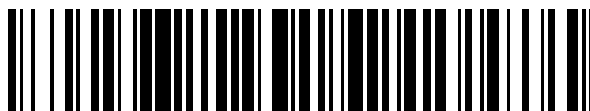


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 283**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06742963 .9**  
96 Fecha de presentación: **17.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1888641**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Proteínas de unión a albúmina sérica**

30 Prioridad:  
**18.05.2005 US 682332 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.04.2012**

73 Titular/es:  
**Ablynx N.V.**  
**Technologiepark 21**  
**9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:  
**BEIRNAERT, Els;**  
**REVETS, Hilde Adi Pierette y**  
**HOOGENBOOM, Hendricus Renerus Jacobus**  
**Mattheus**

74 Agente/Representante:  
**Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás**

ES 2 379 283 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión a albúmina sérica.

La presente invención se refiere a secuencias de aminoácidos que pueden unirse a albúmina sérica tal como se define en la reivindicación 1, a proteínas y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en tales secuencias de aminoácidos; a ácidos nucleicos que codifican para tales secuencias de aminoácidos, proteínas o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales secuencias de aminoácidos, proteínas y polipéptidos; y a usos de tales secuencias de aminoácidos, proteínas y polipéptidos.

Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención se aclararán a partir de la descripción adicional en el presente documento.

En la técnica se conocen secuencias de aminoácidos que pueden unirse a albúmina sérica humana y usos de las mismas en constructos polipeptídicos con el fin de aumentar la semivida de proteínas y polipéptidos terapéuticamente relevantes.

Por ejemplo, los documentos WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 02/076489 describen restos peptídicos que se unen a albúmina sérica que pueden fusionarse a proteínas terapéuticas y a otras entidades y compuestos terapéuticos con el fin de aumentar la semivida de los mismos. Sin embargo, estos restos peptídicos son de origen bacteriano o sintético, que se prefiere menos para su uso en terapéutica.

El documento WO 04/041865 del solicitante describe Nanobodies<sup>®</sup> dirigidos contra la albúmina sérica (y en particular contra la albúmina sérica humana) que pueden unirse a otras proteínas (tales como uno o más de otros Nanobodies<sup>®</sup> dirigidos contra una diana deseada) con el fin de aumentar la semivida de dicha proteína.

El receptor de Fc neonatal (FcRn), también denominado "receptor de Brambell", está implicado en prolongar la vida de la albúmina en circulación (véase Chaudhury, *et al.*, The Journal of Experimental Medicine, vol. 3, n.º 197, 315-322 (2003)). El receptor FcRn es una glicoproteína integral de membrana que consiste en una cadena ligera soluble que consiste en  $\beta$ 2-microglobulina, unida de manera no covalente a una cadena  $\alpha$  de 43 kD con tres dominios extracelulares, una región transmembrana y una cola citoplasmática de aproximadamente 50 aminoácidos. La cola citoplasmática contiene una señal de endocitosis basada en un motivo dinucleotídico implicada en la internalización del receptor. La cadena  $\alpha$  es un miembro de la familia del CMH I no clásico de proteínas. La asociación de  $\beta$ 2m con la cadena  $\alpha$  es crítica para el plegamiento correcto de FcRn y la salida del retículo endoplasmático para dirigirse a endosomas y a la superficie celular.

La estructura global de FcRn es similar a la de las moléculas de clase I. Las regiones  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 se asemejan a una plataforma compuesta de ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas que forman una única lámina  $\beta$  coronada por dos hélices  $\alpha$  antiparalelas que se asemejan muy estrechamente a la hendidura peptídica en las moléculas de CMH I. Debido a una recolocación global de la hélice  $\alpha$ -1 y al curvado de su parte C-terminal de la hélice  $\alpha$ -2 debido a una interrupción en la hélice introducida por la presencia de Pro162, las hélices de FcRn están considerablemente más próximas entre sí, ocluyendo la unión peptídica. La cadena lateral de Arg164 de FcRn también ocluye la interacción potencial del extremo N-terminal del péptido con el bolsillo de CMH. Además, un puente salino y la interacción hidrófoba entre las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 también pueden contribuir al cierre del surco.

Por tanto, el FcRn no participa en la presentación de antígenos, y la hendidura peptídica está vacía.

El FcRn se une a y transporta la IgG a través del sincitiotrofoblasto de la placenta desde la circulación materna hasta la circulación fetal y protege a la IgG frente a la degradación en adultos. Además de la homeostasis, el FcRn controla la transcitosis de la IgG en tejidos. El FcRn se ubica en células epiteliales, células endoteliales y hepatocitos.

Según Chaudhury *et al.* (citado anteriormente), la albúmina se une al FcRn para formar un complejo trimolecular con la IgG. Tanto la albúmina como la IgG se unen de manera no cooperativa a distintos sitios en el FcRn. La unión del FcRn humano a Sepharose-HSA y Sepharose-hIgG era dependiente del pH, siendo máxima a pH 5,0 y nula a de pH 7,0 a pH 8. La observación de que el FcRn se une a albúmina de la misma forma dependiente del pH en que se une a IgG sugiere que el mecanismo por el que la albúmina interacciona con el FcRn y por tanto se protege frente a la degradación, es idéntico al de la IgG, y está mediado por una interacción con FcRn sensible al pH de manera similar. Usando SPR (*surface plasmon resonance*, resonancia de plasmón superficial) para medir la capacidad de los dominios individuales de HSA para unirse a hFcRn soluble inmovilizado, Chaudhury demostró que el FcRn y la albúmina interaccionan a través del dominio D-III de la albúmina de una manera dependiente del pH, en un sitio distinto del sitio de unión a IgG (Chaudhury, PhD dissertation, véase <http://www.andersonlab.com/biosketchCC.htm>; Chaudhury *et al.* Biochemistry, ASAP, Artículo 10.1021/bi052628y S0006-2960(05)02628-0 (fecha de publicación en la web: 22 de marzo de 2006)).

Un objeto de la presente invención es proporcionar secuencias de aminoácidos que constituyan una alternativa, y en particular una alternativa mejorada, a las secuencias de aminoácidos de unión a albúmina descritas en la técnica anterior citada anteriormente.

En un aspecto, la invención logra este objetivo proporcionando secuencias de aminoácidos, que son secuencias de inmunoglobulina tal como se define en la reivindicación 1, y más en particular secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, que pueden unirse a o asociarse de otro modo con la albúmina sérica de tal forma que, cuando la secuencia de aminoácidos o constructo polipeptídico se une a o se asocia de otro modo con una molécula de albúmina sérica, la unión de dicha molécula de albúmina sérica al FcRn no se reduce ni inhibe (significativamente) (es decir, en comparación con la unión de dicha molécula de albúmina sérica al FcRn cuando la secuencia de aminoácidos o constructo polipeptídico no se une a la misma). En este aspecto de la invención, por “no se reduce ni inhibe significativamente” quiere decirse que la afinidad de unión para la albúmina sérica a FcRn (tal como se mide usando un ensayo adecuado, tal como SPR) no se reduce en más del 50%, preferiblemente no se reduce en más del 30%, incluso más preferiblemente no se reduce en más del 10%, tal como que no se reduce en más del 5%, o esencialmente no se reduce en absoluto. En este aspecto de la invención, “no se reduce ni inhibe significativamente” también puede significar (o puede significar adicionalmente) que la semivida de la molécula de albúmina sérica no se reduce significativamente (tal como se define más adelante).

Cuando en esta descripción se hace referencia a unión, tal unión es preferiblemente unión específica, tal como entiende normalmente el experto.

Cuando una secuencia de aminoácidos tal como se describe en el presente documento es una secuencia de inmunoglobulina monovalente (por ejemplo, un nanocuerpo monovalente), dicha secuencia de inmunoglobulina monovalente preferiblemente se une a la albúmina sérica humana con una constante de disociación (KD) de  $10^5$  a  $10^{-12}$  moles/litro o inferior, y preferiblemente de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o inferior y más preferiblemente de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro, y/o con una afinidad de unión de al menos  $10^7$  M-I, preferiblemente de al menos  $10^8$  M-I, más preferiblemente de al menos  $10^9$  M-I, tal como de al menos  $10^{12}$  M-I. Generalmente se considera que cualquier valor de KD superior a  $10^4$  litros/mol indica unión no específica. Preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina monovalente de la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad inferior a 500 nM, preferiblemente inferior a 200 nM, más preferiblemente inferior a 10 nM, tal como inferior a 500 pM. La unión específica de una proteína de unión a antígenos a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos competitivos de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas *per se* en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona secuencias de aminoácidos que son secuencias de inmunoglobulina tal como se define en la reivindicación 1, y más en particular secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, que pueden unirse a o asociarse de otro modo con albúmina sérica de tal forma que, cuando la secuencia de aminoácidos o constructo polipeptídico se une a o se asocia de otro modo con una molécula de albúmina sérica, la semivida de la molécula de albúmina sérica no se reduce (significativamente) (es decir, en comparación con la semivida de la molécula de albúmina sérica cuando la secuencia de aminoácidos o constructo polipeptídico no se une a la misma). En este aspecto de la invención, por “no se reduce significativamente” quiere decirse que la semivida de la molécula de albúmina sérica (tal como se mide usando una técnica adecuada conocida *per se*) no se reduce en más del 50%, preferiblemente no se reduce en más del 30%, incluso más preferiblemente no se reduce en más del 10%, tal como que no se reduce en más del 5%, o esencialmente no se reduce en absoluto.

En otro aspecto, la invención proporciona secuencias de aminoácidos, que son secuencias de inmunoglobulina tal como se define en la reivindicación 1, y más en particular secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, que pueden unirse a residuos de aminoácidos en la albúmina sérica que no están implicados en la unión de la albúmina sérica a FcRn. Más en particular, este aspecto de la invención proporciona secuencias de aminoácidos que pueden unirse a secuencias de aminoácidos de la albúmina sérica que no forman parte del dominio III de la albúmina sérica. Por ejemplo, pero sin querer limitarse al mismo, este aspecto de la invención proporciona secuencias de aminoácidos que pueden unirse a secuencias de aminoácidos de la albúmina sérica que forman parte del dominio I y/o del dominio II.

Las secuencias de aminoácidos de la invención son preferiblemente anticuerpos de (un solo) dominio o adecuadas para su uso como anticuerpos de (un solo) dominio, y como tales pueden ser una secuencia de dominio variable de cadena pesada (secuencia de VH) o una secuencia de dominio variable de cadena ligera (secuencia de VL), y preferiblemente son secuencias de VH. Las secuencias de aminoácidos pueden denominarse por ejemplo “dAc”.

Sin embargo, según una realización particularmente preferida, las secuencias de aminoácidos de la presente invención son nanocuerpos. Para una descripción y definición adicionales de los nanocuerpos, así como de algunos de los términos adicionales usados en la presente descripción, se hace referencia a las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del solicitante (tales como la solicitud internacional en tramitación junto con la presente del solicitante titulada “Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha”, que tiene la misma fecha de prioridad y de presentación internacional que la presente solicitud); así como a la técnica anterior adicional citada en ellas.

Como tales, pueden ser nanocuerpos que pertenecen a la clase “KERE”, a la clase “GLEW” o a la clase “103-P,R,S” (de nuevo tal como se define en las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del solicitante).

Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de la presente invención son nanocuerpos humanizados (de nuevo tal como se define en las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del solicitante).

Las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en el presente documento pueden usarse ventajosamente como pareja de fusión con el fin de aumentar la semivida de restos terapéuticos tales como proteínas, compuestos (incluyendo, sin limitación, pequeñas moléculas) u otras entidades terapéuticas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona proteínas o polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos tal como se da a conocer en el presente documento. En particular, la invención proporciona constructos proteicos o polipeptídicos que comprenden o consisten esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos de la invención que se une a al menos un resto terapéutico, opcionalmente a través de uno o más ligadores o espaciadores adecuados. Tales constructos proteicos o polipeptídicos pueden ser por ejemplo (sin limitación) una proteína de fusión, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

La invención se refiere además a los usos terapéuticos de los constructos proteicos o polipeptídicos o constructos y proteínas de fusión y a composiciones farmacéuticas que comprenden tales constructos proteicos o polipeptídicos o proteínas de fusión.

En algunas realizaciones, el al menos un resto terapéutico comprende o consiste esencialmente en una proteína, polipéptido, compuesto, factor u otra entidad terapéuticos. En una realización preferida, el resto terapéutico se dirige contra un antígeno o diana deseado, puede unirse a un antígeno deseado (y en particular puede unirse específicamente a un antígeno deseado), y/o puede interactuar con una diana deseada. En otra realización, el al menos un resto terapéutico comprende o consiste esencialmente en una proteína o polipéptido terapéuticos. En una realización adicional, el al menos un resto terapéutico comprende o consiste esencialmente en una inmunoglobulina o secuencia de inmunoglobulina (incluyendo pero sin limitarse a un fragmento de una inmunoglobulina), tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (incluyendo pero sin limitarse a un fragmento ScFv). Todavía en otra realización, el al menos un resto terapéutico comprende o consiste esencialmente en un dominio variable de anticuerpo, tal como un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera.

En una realización preferida, el al menos un resto terapéutico comprende o consiste esencialmente en al menos un anticuerpo de dominios o anticuerpo de un solo dominio, "dAc" o Nanobody<sup>®</sup>. Según esta realización, la secuencia de aminoácidos de la invención también es preferiblemente un anticuerpo de dominios o anticuerpo de un solo dominio, "dAc" o nanocuerpo, de modo que el constructo o proteína de fusión resultante es un constructo multivalente (tal como se describe en el presente documento) y preferiblemente un constructo multiespecífico (también tal como se define en el presente documento) que comprende al menos anticuerpos de dos dominios, anticuerpos de un solo dominio, "dAc" o Nanobodies<sup>®</sup> (o una combinación de los mismos), dirigiéndose al menos uno de ellos contra (tal como se define en el presente documento) la albúmina sérica.

En una realización específica, el al menos un resto terapéutico comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanobody<sup>®</sup> monovalente o un constructo de Nanobody<sup>®</sup> bivalente, multivalente, biespecífico o multiespecífico. Según esta realización, la secuencia de aminoácidos de la invención es también preferiblemente un nanocuerpo, de modo que el constructo o proteína de fusión resultante es un constructo de nanocuerpo multivalente (tal como se describe en el presente documento) y preferiblemente un constructo de nanocuerpo multiespecífico (también tal como se define en el presente documento) que comprende al menos dos nanocuerpos, dirigiéndose al menos uno de ellos contra (tal como se define en el presente documento) la albúmina sérica.

Según una realización de la invención, el nanocuerpo contra la albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.

Además, cuando las secuencias de aminoácidos, proteínas, polipéptidos o constructos de la invención están destinados para uso farmacéutico o de diagnóstico, las moléculas mencionadas anteriormente se dirigen preferiblemente contra la albúmina sérica humana. Según una realización preferida, pero no limitativa, las secuencias de aminoácidos, proteínas, polipéptidos o constructos muestran una afinidad por la albúmina sérica humana que es mayor que la afinidad por la albúmina sérica de ratón (determinada tal como se describe en la Parte experimental).

Según una realización preferida, pero no limitativa, la secuencia de aminoácidos de la invención se dirige al mismo epítipo en la albúmina sérica humana que el clon PMP6A6 (ALB-1).

Según una realización específica, pero no limitativa, la secuencia de aminoácidos de la invención es una secuencia de inmunoglobulina (y preferiblemente un nanocuerpo) que puede unirse a la albúmina sérica humana que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en la que:

a) CDR1 es una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;

y en la que:

b) CDR2 es una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;

y en la que:

c) CDR3 es una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

y en la que las secuencias de entramado pueden ser cualquier secuencia de entramado adecuada, tales como las secuencias de entramado de un anticuerpo de (un solo) dominio y en particular de un nanocuerpo.

5 En las secuencias de aminoácidos anteriores:

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

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferiblemente sólo contiene sustituciones de aminoácidos, y no deleciones ni inserciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores.

10 En la tabla I a continuación pueden observarse algunas combinaciones de secuencias de CDR en los nanocuerpos y algunas combinaciones de secuencias de CDR y entramado en los nanocuerpos.

La tabla II a continuación enumera algunos nanocuerpos. La tabla III a continuación enumera algunos nanocuerpos humanizados preferidos de la invención.

Tabla I: Combinaciones de secuencias de CDR, y combinación preferida de secuencia de CDR y secuencia de entramado

CLON	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2
PMP6A8(ALB2)	1	AVQLVESGGGLVQGGSLRLACAASERIFD	8	LNLMG	15	WYRQGPGERELVA	22	TCITVGGDSTNYADSVKGG
PMP6B4	2	EVQLVESGGGLVQEGGSLRLACAASERIWD	9	INLLG	16	WYRQGPGERELVA	23	TITVGGDSTSYADSVKGG
PMP6A6(ALB1)	3	AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFR	10	SFGMS	17	WVRQAPGKEPEWVS	24	SISGSGSDTLYADSVKGG
PMP6C1	4	AVQLVDSGGGLVQPGNSLRLSCAASGFSFG	11	SFGMS	18	WVRQYPGKEPEWVS	25	SINGRGDDTRYADSVKGG
PMP6G8	5	AVQLVESGGGLVQPGNSLRLTCTASGFTFR	12	SFGMS	19	WVRQAPGKDQEWVS	26	AISADSSTKNYADSVKGG
PMP6A5	6	QVQLAESGGGLVQPGNSLRLTCTASGFTFG	13	SFGMS	20	WVRQAPGEGLEWVS	27	AISADSSDKRYADSVKGG
PMP6G7	7	QVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS	14	NYWMY	21	WVRVAPGKGLERIS	28	RDISTGGGYSYADSVKGG

CLON	con.	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4	ID
PMP6A8(ALB2)	29	RFTISMDYTKQTVYLHMNSLRPEDTGLYYCKI	36	RRTWHSEL	43	WGQGTQVTVSS		
PMP6B4	30	RFTISRDYDKNTLYLQMNLSLRPEDTGLYYCKI	37	RRTWHSEL	44	WGQGTQVTVSS		
PMP6A6(ALB1)	31	RFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRKPEDTAVYYCTI	38	GGSLSR	45	SSQGTQVTVSS		
PMP6C1	32	RFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRKPEDTAEYYCTI	39	GRSVRS	46	RTQGTQVTVSS		
PMP6G8	33	RFTISRDNAKKMLYLEMNSLRKPEDTAVYYCVI	40	GRGSP	47	SSPGTQVTVSS		
PMP6A5	34	RFTISRDNAKKMLYLEMNSLRKSEDTAVYYCVI	41	GRGSP	48	ASQGTQVTVSS		
PMP6G7	35	RFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRKPEDTALYYCAK	42	DREAQVDTLDFDY	49	RGQGTQVTVSS		

Tabla II: Nanocuerpos.

PMP6A8 (ALB2)	50	AVQLVESGGGLVQGGSLRLACAASERIFDLNLMGWYRQPGNERE LVATCITVG . DSTNYADSVKGRFTISM DYTKQTVYLHMNSLRPEDT GLYYCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS
PMP6B4	51	EVQLVESGGGLVQEGGSLRLACAASERIIDINLLGWYRQPGNERE LVATITVG . DSTSYADSVKGRFTISR DYDKNTLYLQMNLSLRPEDTG LYYCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS
PMP6A6 (ALB1)	52	AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
PMP6C1	53	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSFGMSWVRQYPGKEPE WVSSINGRGGDDTRYADSVKGRFISRDN AKTTLYLQMNLSLKPEDTA EYYCTIGRSVSRSRQTQGTQVTVSS
PMP6G8	54	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKDQE WVSAISADSSTKNYADSVKGRFTISRDN AKKMLYLEMNSLKPEDTA VYYCVIGRGSPPSGTQVTVSS
PMP6A5	55	QVQLAESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFGSFGMSWVRQAPGEGLE WVSAISADSSDKRYADSVKGRFTISRDN AKKMLYLEMNSLKS EDTA VYYCVIGRGSPPASQGTQVTVSS
PMP6G7	56	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWYWVRVAPGKGLE RISRDI STGGYSYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLKPEDT ALYYCAKDREAQVDTLDFDYRGOGTQVTVSS

Tabla III: Nanocuerpos humanizados preferidos, pero no limitativos, de la invención.

ALB3 (ALB1 HUM1)	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB4 (ALB1 HUM2)	58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB5 (ALB1 HUM3)	59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB6( ALB1 HUM1)	60	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
ALB7 (ALB1 HUM2)	61	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
ALB8 (ALB1 HUM3)	62	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
ALB9 (ALB1 HUM4)	63	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSO GT LVTVSS
ALB10 (ALB1 HUM5)	64	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNLSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSGO GT LVTVSS

Por tanto, en otro aspecto, una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento es un nanocuerpo, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 50 a 64.

Por tanto, en otro aspecto, una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento es un nanocuerpo, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 50 a 64, en la que:

- las secuencias de CDR1 presentes en tales nanocuerpos se eligen de las secuencias de CDR1 de SEQ ID NOS: 8 a 14 o de secuencias de aminoácidos con una diferencia de sólo 1 aminoácido con tal secuencia de CDR1;
- las secuencias de CDR2 presentes en tales nanocuerpos se eligen de las secuencias de CDR1 de SEQ ID NOS: 22 a 28 o de secuencias de aminoácidos con una diferencia de sólo 1 aminoácido con tal secuencia de CDR2;
- y las secuencias de CDR1 presentes en tales nanocuerpos se eligen de las secuencias de CDR1 de SEQ ID NOS: 23 a 42 o de secuencias de aminoácidos con una diferencia de sólo 1 aminoácido con tal secuencia de CDR3.

En otro aspecto, una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento es un nanocuerpo, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 50 a 64, en la que:

- las secuencias de CDR1 presentes en tales nanocuerpos se eligen de las secuencias de CDR1 de SEQ ID NOS: 8 a 14;
- las secuencias de CDR2 presentes en tales nanocuerpos se eligen de las secuencias de CDR1 de SEQ ID NOS: 22 a 28;
- y las secuencias de CDR1 presentes en tales nanocuerpos se eligen de las secuencias de CDR1 de SEQ ID NOS: 23 a 42.

Un grupo particularmente preferido de nanocuerpos para su uso en la presente invención comprende el clon PMP6A6 (ALB1; SEQ ID NO: 52) y variantes humanizadas del mismo, incluyendo pero sin limitarse a los clones ALB 3 (SEQ ID NO: 57); ALB 4 (SEQ ID NO: 58); ALB 5 (SEQ ID NO: 59); ALB 6 (SEQ ID NO: 60); ALB 7 (SEQ ID NO: 61); ALB 8 (SEQ ID NO: 62); ALB 9 (SEQ ID NO: 63); y ALB 10 (SEQ ID NO: 64), de los cuales se prefiere particularmente ALB 8 (SEQ ID NO: 62).

Por tanto, en un aspecto preferido, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 52 y 57 a 64.

Por tanto, la secuencia de aminoácidos de la invención preferiblemente es una secuencia de inmunoglobulina (y preferiblemente un nanocuerpo) que puede unirse a la albúmina sérica humana que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en la que:

a) CDR1 comprende, es o consiste esencialmente en:

- la secuencia de aminoácidos SFGMS

y en la que:

b) CDR2 comprende, es o consiste esencialmente en:

- la secuencia de aminoácidos SISGSGSDTLYADSVKG;

y en la que:

c) CDR3 comprende, es o consiste esencialmente en:

- la secuencia de aminoácidos GGSLSR; o

Más en particular, la invención se refiere a un nanocuerpo de este tipo, en el que

- CDR1 comprende o es la secuencia de aminoácidos SFGMS; y CDR3 comprende o es la secuencia de aminoácidos GGSLSR;



o en el que:

- CDR1 comprende o es la secuencia de aminoácidos SFGMS; y CDR2 comprende o es la secuencia de aminoácidos SISGSGSDTLYADSVKG;

o en el que:

- CDR2 comprende o es la secuencia de aminoácidos SISGSGSDTLYADSVKG; y CDR3 comprende o es la secuencia de aminoácidos GGSLR.

Incluso más en particular, la invención se refiere a un nanocuerpo de este tipo, en el que CDR1 comprende o es la secuencia de aminoácidos SFGMS; CDR2 comprende o es la secuencia de aminoácidos SISGSGSDTLYADSVKG y CDR3 comprende o es la secuencia de aminoácidos GGSLR.

Estas secuencias de aminoácidos tienen de nuevo una identidad de secuencia de preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS 52 y 57 a 64.

También, de nuevo, estas secuencias de aminoácidos están preferiblemente humanizadas, tal como se describe en las solicitudes en tramitación junto con la presente del solicitante. Algunas sustituciones humanizantes preferidas estarán claras para el experto, por ejemplo comparando la secuencia no humanizada de SEQ ID NO: 52 con las secuencias humanizadas correspondientes de SEQ ID NOS: 57-64.

Cuando la secuencia de aminoácidos es una secuencia de inmunoglobulina tal como una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina, también puede usarse un fragmento adecuado (es decir, adecuado para los fines mencionados en el presente documento) de una secuencia de este tipo. Por ejemplo, cuando la secuencia de aminoácidos es un nanocuerpo, un fragmento de este tipo puede ser esencialmente tal como se describe en el documento WO04/041865.

La invención también se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos tal como se describe en el presente documento, o un fragmento adecuado de la misma.

Tal como se menciona en el presente documento, las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento pueden usarse ventajosamente como pareja de fusión con el fin de aumentar la semivida de restos terapéuticos tales como proteínas, compuestos (incluyendo, sin limitación, pequeñas moléculas) u otras entidades terapéuticas. Por tanto, una realización de la invención se refiere a un constructo o proteína de fusión que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la invención y al menos un resto terapéutico. Un constructo o proteína de fusión de este tipo tiene preferiblemente una semivida aumentada, en comparación con el resto terapéutico *per se*. Generalmente, tales constructos y proteínas de fusión pueden ser (prepararse y usarse) tal como se describe en la técnica anterior citada anteriormente, pero con una secuencia de aminoácidos de la invención en lugar de los restos de aumento de la semivida descritos en la técnica anterior.

Generalmente, los constructos o proteínas de fusión descritos en el presente documento tienen preferiblemente una semivida que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, superior que la semivida del resto terapéutico correspondiente *per se*.

Además, preferiblemente, cualquier constructo o proteína de fusión de este tipo tiene una semivida que ha aumentado en más de 1 hora, preferiblemente en más de 2 horas, más preferiblemente en más de 6 horas, tal como en más de 12 horas, en comparación con la semivida del resto terapéutico correspondiente *per se*.

Además, preferiblemente, cualquier constructo o proteína de fusión tiene una semivida que es de más de 1 hora, preferiblemente de más de 2 horas, más preferiblemente de más de 6 horas, tal como de más de 12 horas, y por ejemplo de aproximadamente un día, dos días, una semana, dos semanas o tres semanas, y preferiblemente de no más de 2 meses, aunque esto último puede ser menos crítico.

La semivida puede definirse generalmente como el tiempo que tarda la concentración sérica del polipéptido en reducirse en un 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación del ligando y/o al aclaramiento o secuestro del ligando mediante mecanismos naturales. Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos para el análisis farmacocinético y la determinación de la semivida. Pueden encontrarse detalles en Kenneth, A *et al*: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters *et al*, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición revisada (1982).

Además, tal como se mencionó anteriormente, cuando la secuencia de aminoácidos de la invención es un nanocuerpo, puede usarse para aumentar la semivida de otras secuencias de inmunoglobulina, tales como anticuerpos de dominios, anticuerpos de un solo dominio, "dAc" o nanocuerpos.

Por tanto, una realización de la invención se refiere a un constructo o proteína de fusión que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la invención y al menos una secuencia de inmunoglobulina, tal como

anticuerpos de dominios, anticuerpos de un solo dominio, "dAc" o nanocuerpos. La secuencia de inmunoglobulina se dirige preferiblemente contra una diana deseada (que es preferiblemente una diana terapéutica), y/u otra secuencia de inmunoglobulina que es útil o adecuada para fines terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un constructo de nanocuerpo multiespecífico (y en particular biespecífico) que comprende al menos un nanocuerpo tal como se describe en el presente documento, y al menos otro nanocuerpo, en el que dicho al menos otro nanocuerpo se dirige preferiblemente contra una diana deseada (que es preferiblemente una diana terapéutica), y/u otro nanocuerpo que es útil o adecuado para fines terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico.

Para una descripción general de los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más nanocuerpos y su preparación, también se hace 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 a por ejemplo los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221. Pueden encontrarse algunos otros ejemplos de algunos polipéptidos multiespecíficos y/o multivalentes específicos de la invención en las solicitudes en tramitación junto con la presente del solicitante. En particular, para una descripción general de constructos multivalentes y multiespecíficos que comprenden al menos un nanocuerpo contra una proteína sérica para aumentar la semivida, de ácidos nucleicos que codifican para los mismos, de composiciones que comprenden los mismos, de la preparación de las moléculas mencionadas anteriormente, y de los usos de las moléculas mencionadas anteriormente, se hace referencia a la solicitud internacional WO 04/041865 del solicitante mencionada anteriormente. Las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento pueden usarse generalmente de manera análoga a los nanocuerpos de aumento de la semivida descritos en ella.

En una realización no limitativa, dicho otro nanocuerpo se dirige contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), en forma monomérica y/o multimérica (es decir, trimérica). Pueden encontrarse algunos ejemplos de tales constructos de nanocuerpo en la solicitud internacional en tramitación junto con la presente titulada "Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha", que tiene la misma fecha de prioridad y de presentación internacional que la presente solicitud.

La invención también se refiere a secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos, constructos y proteínas de fusión descritos en el presente documento. La invención incluye además constructos genéticos que incluyen las secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos anteriores y uno o más elementos para constructos genéticos conocidos *per se*. El constructo genético puede estar en forma de un plásmido o vector. De nuevo, tales constructos pueden ser generalmente tal como se describe en las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del solicitante descritas en el presente documento, tales como el documento WO 04/041862 o la solicitud internacional en tramitación junto con la presente del solicitante titulada "Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha".

La invención también se refiere a huéspedes o células huésped que contienen tales secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos, y/o que expresan (o pueden expresar) las secuencias de aminoácidos, constructos y proteínas de fusión descritos en el presente documento. De nuevo, tales células huésped pueden ser generalmente tal como se describe en las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del solicitante descritas en el presente documento, tales como el documento WO04/041862 o la solicitud internacional en tramitación junto con la presente del solicitante titulada "Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha".

La invención también se refiere a un método para preparar una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión tal como se describe en el presente documento, comprendiendo el método cultivar o mantener una célula huésped tal como se describe en el presente documento en condiciones tales que dicha célula huésped produce o expresa una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión tal como se describe en el presente documento, y opcionalmente comprende además aislar la secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión así producido. De nuevo, tales métodos pueden realizarse tal como se describe generalmente en las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del solicitante descritas en el presente documento, tales como el documento WO04/041862 o la solicitud internacional en tramitación junto con la presente del solicitante titulada "Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha".

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión tal como se describe en el presente documento, y opcionalmente al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales preparaciones, vehículos, excipientes y diluyentes pueden ser generalmente tal como se describe en las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del solicitante descritas en el presente documento, tales como el documento WO04/041862 o la solicitud internacional en tramitación junto con la presente del solicitante titulada "Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha".

Sin embargo, puesto que las secuencias de aminoácidos, constructos o proteínas de fusión descritos en el presente documento tienen una semivida aumentada, preferiblemente se administran a la circulación. Como tales, pueden administrarse de cualquiera manera adecuada que permita que las secuencias de aminoácidos, constructos o proteínas de fusión entren en la circulación, tal como por vía intravenosa, mediante inyección o infusión, o de cualquier otra manera adecuada (incluyendo administración oral, administración a través de la piel, administración intranasal,

administración a través de los pulmones, etc.) que permita que las secuencias de aminoácidos, constructos o proteínas de fusión entren en la circulación. Los métodos y vías de administración adecuados estarán claros para el experto, de nuevo por ejemplo también a partir de las enseñanzas del documento WO 04/041862 o de la solicitud internacional en tramitación junto con la presente del solicitante titulada "Improved Nanobodies™ against Tumor Necrosis Factor-alpha".

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede prevenirse o tratarse mediante el uso de un constructo o proteína de fusión tal como se describe en el presente documento, uso que comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un constructo o proteína de fusión de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo. Las enfermedades y trastornos que pueden prevenirse o tratarse mediante el uso de un constructo o proteína de fusión tal como se describe en el presente documento serán generalmente los mismos que las enfermedades y trastornos que pueden prevenirse o tratarse mediante el uso del resto terapéutico que está presente en el constructo o proteína de fusión de la invención.

En el contexto de la presente invención, el término "prevención y/o tratamiento" no sólo comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, sino que generalmente también comprende prevenir la aparición de la enfermedad, ralentizar o invertir el progreso de la enfermedad, prevenir o ralentizar la aparición de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir y/o aliviar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir la gravedad y/o la duración de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con ella y/o prevenir un aumento adicional en la gravedad de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con ella, prevenir, reducir o revertir cualquier daño fisiológico producido por la enfermedad, y generalmente cualquier acción farmacológica que sea beneficiosa para el paciente que está tratándose.

El sujeto que va a tratarse puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero en particular es un mamífero, y más en particular un ser humano. Como estará claro para el experto, el sujeto que va a tratarse será en particular una persona que padece, o que corre el riesgo de padecer, las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento.

En otra realización, la invención se refiere al uso en un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, comprendiendo el método administrar, a un sujeto que padece o que corre el riesgo de padecer las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, una cantidad farmacéuticamente activa de un constructo o proteína de fusión de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

El constructo o proteína de fusión y/o las composiciones que comprenden el mismo se administran según un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno que va a prevenirse o tratarse. El médico podrá determinar generalmente un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o el trastorno que va a prevenirse o tratarse, la gravedad de la enfermedad que va a tratarse y/o la gravedad de los síntomas de la misma, el nanocuerpo o polipéptido específico de la invención que va a usarse, la vía de administración y la formulación farmacéutica o la composición específica que va a usarse, la edad, el sexo, el peso, la dieta, el estado general del paciente, y factores similares bien conocidos por el médico.

Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de uno o más constructos o proteínas de fusión de la invención, o de una o más composiciones que comprenden el mismo, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente eficaces. El médico puede determinar la(s) cantidad(es) o dosis específicas que deben administrarse, basándose de nuevo en los factores citados anteriormente.

Generalmente, para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento y dependiendo de la enfermedad o trastorno específico que va a tratarse, de la potencia y/o de la semivida de los constructos o proteínas de fusión específicos que van a usarse, de la vía de administración específica y de la formulación o composición farmacéutica usada, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se administrarán generalmente en una cantidad de entre 1 gramo y 0,01 microgramos por kg de peso corporal al día, preferiblemente de entre 0,1 gramos y 0,1 microgramos por kg de peso corporal al día, tal como de aproximadamente 1, 10, 100 ó 1000 microgramos por kg de peso corporal al día, o bien de manera continua (por ejemplo, mediante infusión), como una dosis diaria única o bien como múltiples dosis divididas durante el día. El médico podrá determinar generalmente una dosis diaria adecuada, dependiendo de los factores mencionados en el presente documento. También estará claro que en casos específicos, el médico puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo basándose en los factores citados anteriormente y en su criterio experto. Generalmente, puede obtenerse alguna orientación sobre las cantidades que deben administrarse a partir de las cantidades administradas habitualmente para anticuerpos o fragmentos de anticuerpos convencionales comparables contra la misma diana administrados a través de esencialmente la misma vía, teniendo en cuenta sin embargo las diferencias en la afinidad/avidéz, eficacia, biodistribución, semivida y factores similares, bien conocidos por el experto.

Habitualmente, en el método anterior, se usará un único nanocuerpo o polipéptido de la invención. Sin embargo está dentro del alcance de la invención usar dos o más nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención en combinación.

Los nanocuerpos y polipéptidos de la invención también pueden usarse en combinación con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir como un régimen de tratamiento combinado,

que puede conducir o no a un efecto sinérgico. De nuevo, el médico podrá seleccionar tales compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basándose en los factores citados anteriormente y en su criterio experto.

En particular, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden usarse en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos que se usan o pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y trastornos que pueden prevenirse o tratarse con los constructos o proteínas de fusión de la invención, y como resultado de lo cual puede obtenerse o no un efecto sinérgico.

La eficacia del régimen de tratamiento usado según la invención puede determinarse y/o someterse a seguimiento de cualquier manera conocida *per se* para la enfermedad o trastorno implicado, como estará claro para el médico. El médico también podrá, cuando resulte apropiado y dependiendo de cada caso, cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir efectos secundarios no deseados y/o para lograr un equilibrio apropiado entre lograr el efecto terapéutico deseado por una parte y evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados, por otra.

Generalmente, se seguirá el régimen de tratamiento hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o mientras que se mantenga el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede determinarlo el médico.

El sujeto que va a tratarse puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero en particular es un mamífero, y más en particular un ser humano. Como estará claro para el experto, el sujeto que va a tratarse será en particular una persona que padece, o que corre el riesgo de padecer, las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento.

### **Parte experimental**

#### **Ejemplo 1: Identificación de nanocuerpos específicos de albúmina sérica**

Se identificaron los nanocuerpos específicos de albúmina a partir de una llama inmunizada con albúmina sérica humana. Se realizó la detección de los nanocuerpos individuales mediante ELISA usando albúmina humana, de mono rhesus y de ratón, produciendo un panel de nanocuerpos que reaccionan de manera cruzada con la albúmina sérica de diversas especies.

#### **Ejemplo 2: Análisis de Biacore**

Se caracterizó la unión de nanocuerpos a albúmina sérica mediante resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore 3000. Se unió de manera covalente albúmina sérica de diferentes especies a la superficie de chips sensores CM5 a través de acoplamiento de amina hasta que se alcanzó un aumento de 250 unidades de respuesta. Se inactivaron los grupos reactivos restantes. Se evaluó la unión de los nanocuerpos a una concentración (diluida 1 en 20). Se inyectó cada nanocuerpo durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45  $\mu\text{l}/\text{min}$ . para permitir la unión al antígeno unido al chip. Se hizo pasar tampón de unión sin nanocuerpo sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación espontánea del nanocuerpo unido durante 4 horas. Se calcularon los valores de  $K_{\text{off}}$  a partir de los sensogramas obtenidos para los diferentes nanocuerpos. Los nanocuerpos sometidos a prueba se clasifican según los valores de  $K_{\text{off}}$ , véase la tabla IV a continuación.

**Tabla IV:**

<b>Clase</b>	<b>Ser humano</b>	<b>Mono rhesus</b>	<b>Ratón</b>
C	PMP6A8	PMP6A8	PMP6B4
C	PMP6B4	PMP6B4	PMP6A8
B	PMP6A6	PMP6A6	PMP6A6
B	PMP6C1	PMP6C1	PMP6C1
A	PMP6G8	PMP6G8	PMP6G8
A	PMP6A5	PMP6A5	PMP6A5
D	PMP6G7	PMP6G7	PMP6G7

En un experimento de seguimiento, se sometió a ensayo la unión tal como se describió anteriormente excepto en que se usaron series de concentraciones diferentes. Se inyectó cada concentración durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45  $\mu\text{l}/\text{min}$ . para permitir la unión al antígeno unido al chip. Se hizo pasar tampón de unión sin

analito sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación del nanocuerpo unido. Tras 15 minutos, se eliminó el analito unido restante mediante la inyección de la disolución de regeneración (NaOH 25 mM).

Se calcularon los valores de  $K_D$  a partir de los sensogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de cada analito a través de la afinidad en estado estacionario cuando se alcanzó el equilibrio.

En la tabla V se resumen los resultados. Se observa reactividad cruzada tanto para ALB1 como para ALB2. Se observa la mayor afinidad para ALB2 en TNF $\alpha$  de ser humano y mono rhesus. Sin embargo, la diferencia en la afinidad para la albúmina sérica de ser humano/mono rhesus frente a la de ratón es más pronunciada para ALB2 (factor 400), mientras que para ALB1 se observa una diferencia de un factor 12.

**Tabla V:**

		<b>Albúmina de ser humano</b>	<b>Albúmina de mono rhesus</b>	<b>Albúmina de ratón</b>
<b>ALB1</b>	<b>KD (nM)</b>	0,57	0,52	6,5
	<b>ka (1/Ms)</b>	1,11E+06	1,05E+06	1,11E+06
	<b>kd (1/s)</b>	6,30E-04	5,46E-04	7,25E-03
<b>ALB2</b>	<b>KD (nM)</b>	0,092	0,036	15,7
	<b>- (1/Ms)</b>	8,15E+05	1,94E+06	1,95E+05
	<b>kd (1/s)</b>	7,52E-05	7,12E-05	3,07E-03

**REIVINDICACIONES**

1. Secuencia de aminoácidos que es una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a la albúmina sérica humana y que consiste en 4 regiones de entramado, FR1 a FR4 respectivamente, y 3 regiones determinantes de complementariedad, CDR1 a CDR3 respectivamente, en la que:
  - (i) CDR1 comprende o es la secuencia de aminoácidos SFGMS; CDR2 comprende o es la secuencia de aminoácidos SISGSGSDTLYADSVKG; y CDR3 comprende o es la secuencia de aminoácidos GGSLSR y en la que
  - (ii) la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 52 y 57 a 64; y
  - (iii) la secuencia de aminoácidos es la secuencia PMP6A6 según SEQ ID NO: 52, o una variante humanizada de la secuencia PMP6A6 según SEQ ID NO: 52.
2. Secuencia de aminoácidos según la reivindicación 1, que es una variante humanizada de la secuencia PMP6A6 según SEQ ID NO: 52.
3. Secuencia de aminoácidos según la reivindicación 2, que se elige del grupo que comprende los clones ALB 3 según SEQ ID NO: 57; ALB 4 según SEQ ID NO: 58; ALB 5 según SEQ ID NO: 59; ALB 6 según SEQ ID NO: 60; ALB 7 según SEQ ID NO: 61; ALB 8 según SEQ ID NO: 62; ALB 9 según SEQ ID NO: 63; y ALB 10 según SEQ ID NO: 64.
4. Secuencia de aminoácidos según la reivindicación 3, que es ALB 8 según SEQ ID NO: 62.
5. Secuencia de aminoácidos según la reivindicación 1 ó 2, que es un nanocuerpo o un anticuerpo de un solo dominio.
6. Constructo o proteína de fusión, que comprende una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y al menos un resto terapéutico.
7. Constructo o proteína de fusión según la reivindicación 6, en el que la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o bien se une directamente al al menos un resto terapéutico o bien se une al al menos un resto terapéutico a través de un ligador o espaciador.
8. Constructo o proteína de fusión según la reivindicación 6 ó 7, en el que el resto terapéutico comprende una secuencia de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.
9. Constructo o proteína de fusión según la reivindicación 8, en el que el resto terapéutico comprende un anticuerpo de dominios, preferiblemente un anticuerpo de un solo dominio.
10. Constructo de nanocuerpo multivalente y multiespecífico, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que es un nanocuerpo y al menos un nanocuerpo adicional.
11. Constructo de nanocuerpo multivalente y multiespecífico según la reivindicación 10, en el que la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que es un nanocuerpo o bien se une directamente al al menos un nanocuerpo adicional o bien se une al al menos un nanocuerpo adicional a través de un ligador o espaciador.
12. Constructo de nanocuerpo multivalente y multiespecífico según la reivindicación 11, en el que la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que es un nanocuerpo se une al al menos un nanocuerpo adicional a través de un ligador o espaciador, y en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos.
13. Secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
14. Huéspedes o células huésped que contienen una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según la reivindicación 13, y/o que expresan, o pueden expresar, una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
15. Método para preparar una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, comprendiendo el método cultivar o mantener una célula huésped tal como se describe en el presente documento en condiciones tales que dicha célula huésped produce o expresa una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, y opcionalmente comprende además aislar la secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión así producido.

16. Composición farmacéutica que comprende al menos una secuencia de aminoácidos, constructo o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, y opcionalmente al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. Uso de una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como pareja de fusión con el fin de aumentar la semivida de restos terapéuticos.
18. Método de aumento de la semivida de un resto terapéutico que comprende usar una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como pareja de fusión.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ablynx N.V.

<120> Proteínas de unión a albúmina sérica

5

<130> P 06-008 PCT

<160> 64

10

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

15

<213> Artificial

<400> 1

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp  
20 25 30

20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Glu Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Trp Asp  
20 25 30

30

<210> 3



ES 2 379 283 T3

<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <400> 3

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg  
20 25 30

<210> 4  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<400> 4

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Gly  
20 25 30

15

<210> 5  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<400> 5

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg  
20 25 30

25

<210> 6  
<211> 30

ES 2 379 283 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 6

Gln Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly  
20 25 30

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
20 25 30

15 <210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

20 <400> 8

Leu Asn Leu Met Gly  
1 5

<210> 9

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 9

Ile Asn Leu Leu Gly  
1 5

<210> 10

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 10

Ser Phe Gly Met Ser  
1 5

10

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

15

<400> 11

Ser Phe Gly Met Ser  
1 5

20

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 12

Ser Phe Gly Met Ser  
1 5

25

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

30

<213> Artificial

<400> 13

Ser Phe Gly Met Ser  
1 5

<210> 14

<211> 5

5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 14

Asn Tyr Trp Met Tyr  
1 5

10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

15

<400> 15

Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala  
1 5 10

20

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 16

Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala  
1 5 10

25

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Artificial

ES 2 379 283 T3

<400> 17

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser  
1 5 10

<210> 18

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 18

10 Trp Val Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser  
1 5 10

<210> 19

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 19

20 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val Ser  
1 5 10

<210> 20

25 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 20

30 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ser  
1 5 10

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 21

Trp Val Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Ile Ser  
1 5 10

5 <210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

10 <400> 22

Thr Cys Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 16

15 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 23

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
1 5 10 15

20 <210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

25 <400> 24

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

ES 2 379 283 T3

<210> 25  
<211> 17  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<400> 25  
Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

10 <210> 26  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <400> 26  
Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

20 <210> 27  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 27  
Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

25 Gly

<210> 28  
<211> 18

ES 2 379 283 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 28

Arg Asp Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
1 5 10 15

5 Lys Gly

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 29

Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr Leu His  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile  
20 25 30

15 <210> 30

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

20 <400> 30

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile  
20 25 30

25 <210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial



ES 2 379 283 T3

<400> 31

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile  
20 25 30

5 <210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

10 <400> 32

Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Tyr Cys Thr Ile  
20 25 30

15 <210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 33

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

20 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ile  
20 25 30

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

25 <213> Artificial

ES 2 379 283 T3

<400> 34

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ile  
20 25 30

<210> 35

5 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 35

10 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys  
20 25 30

<210> 36

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 36

20 Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu  
1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

25

<400> 37

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu  
1 5

<210> 38  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
5  
<400> 38  
Gly Gly Ser Leu Ser Arg  
1 5  
<210> 39  
10 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<400> 39  
15 Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser  
1 5  
<210> 40  
<211> 5  
<212> PRT  
20 <213> Artificial  
<400> 40  
Gly Arg Gly Ser Pro  
1 5  
25 <210> 41  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial  
30 <400> 41  
Gly Arg Gly Ser Pro  
1 5

ES 2 379 283 T3

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

5

<400> 42

Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 43

10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 43

15

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

20

<213> Artificial

<400> 44

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

25

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

30

<400> 45

Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

ES 2 379 283 T3

<210> 46  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<400> 46

Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 47  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<400> 47

Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

15

<210> 48  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<400> 48

Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

25

<210> 49  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<400> 49

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

ES 2 379 283 T3

<210> 50  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<400> 50  
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Gly Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp Leu Asn  
20 25 30  
Leu Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val  
35 40 45  
Ala Thr Cys Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr  
65 70 75 80  
Leu His Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Lys Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110  
Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 51  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Artificial

<400> 51

ES 2 379 283 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Glu Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Trp Asp Ile Asn  
 20 25 30

Leu Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys  
 85 90 95

Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 52  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <400> 52

ES 2 379 283 T3

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 53

<211> 116

5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 53



ES 2 379 283 T3

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Gly Ser Phe  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 54

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 54

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

ES 2 379 283 T3

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

<210> 55

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 55

ES 2 379 283 T3

Gln Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Phe  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

5 <210> 56  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <400> 56

ES 2 379 283 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Ile  
 35 40 45

Ser Arg Asp Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Lys Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr  
 100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 57

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 57

ES 2 379 283 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 58

<211> 115

5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

ES 2 379 283 T3

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 59

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 59

ES 2 379 283 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

5 <210> 60  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <400> 60

ES 2 379 283 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 61

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 61



ES 2 379 283 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 62

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

ES 2 379 283 T3

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 63

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 63

ES 2 379 283 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
20 25 30  
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ser  
115

<210> 64

5 <211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 64

ES 2 379 283 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115