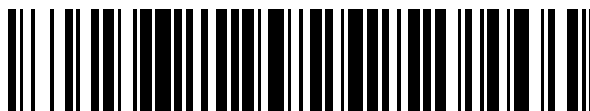


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 164**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06742962 .1**
96 Fecha de presentación: **17.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1888640**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **NanocuerposTM mejorados contra el factor de necrosis tumoral alfa**

30 Prioridad:
18.05.2005 US 682332 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2012

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

72 Inventor/es:
BEIRNAERT, Els

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 164 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

NanocuerposTM mejorados contra el factor de necrosis tumoral alfa

5 La presente invención se refiere un NanocuerposTM contra el factor de necrosis tumoral alfa (TMN-alfa) así como polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más de estos Nanocuerpos. [Nota: NanobodiesTM y NanocloneTM y marcas registradas de Ablynx N.V.]

10 La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales Nanocuerpos y polipéptidos; a células huésped que expresan o son capaces de expresar tales Nanocuerpos o polipéptido; a composiciones que comprenden tales Nanocuerpos y polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped; y a los usos de tales Nanocuerpos, tales polipéptidos, tales ácidos nucleicos, tales células huésped o tales composiciones, en particular con fines profilácticos, terapéuticos o diagnósticos, tales como los fines profilácticos, terapéuticos o diagnósticos mencionados a continuación.

Otros aspectos, formas de realización, ventajas y aplicaciones de la invención se aclararán a partir de la siguiente descripción adicional en la presente.

15 El documento WO 04/041862 se refiere un Nanocuerpos contra TNF-alfa y a la preparación y su uso, en particular para la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con y/o mediados por TNF-alfa, tal como inflamación

20 artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, Diabetes Tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, Lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, y vasculitis.

25 Los nanocuerpos anti-TNF de acuerdo con WO 04/041862 pueden ser humanizados y pueden ser monovalentes o multivalentes, estos últimos que producen aumento de afinidad por TNF. Los NanocuerposTM anti-TNF de acuerdo con WO 04/041862 también pueden ser multiespecíficos, y pueden estar en particular en forma de un constructo multiespecífico que comprende dos o más nanocuerpos contra TNF y un nanocuerpo adicional dirigido contra una proteína sérica tal como albúmina sérica humana, que lleva a un aumento de la vida media in vivo.

30 El documento de WO 04/041862 también se refiere a métodos para la preparación de los Nanocuerpos anti-TNF, un ácidos nucleicos o constructos que codifican los Nanocuerpos anti-TNF, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden los Nanocuerpos anti-TNF, que pueden ser adecuados para la administración intravenosa, subcutánea, oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal o rectal, o para la administración por inhalación. Los Nanocuerpos anti-TNF de acuerdo con WO 04/04 1862 también se pueden usar para fines diagnósticos, opcionalmente en la forma de un kit de partes.

El documento EP 0 486 526 describe los ligandos de unión a TNF-alfa contra un epítipo específico de TNF. Entre los ligandos de unión, se mencionan anticuerpos de dominio únicos ("dAb").

35 Reiter et al, J. Mot. Biol. (1999), 290, 685-698 describen anticuerpos de dominio único contra el TNF-alfa obtenido de una biblioteca de despliegue en fago aleatorizado que se generó a partir de una estructura del dominio VH proveniente de un hibridoma de ratón.

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

40 WEI documento WO 04/003019 entre otros describe los ligandos que comprenden un primer dominio de unión contra TNF-alfa y un segundo dominio de unión contra una proteína sérica tal como albúmina sérica.

Un objetivo general de la presente invención es proporcionar Nanocuerpos contra TNF-alfa, en particular contra TNF-alfa humano.

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

50 Más en particular, un objetivo de la invención es proporcionar Nanocuerpos contra TNF-alfa, y para proporcionar proteínas y polipéptidos que comprenden lo mismo, que son una alternativa a los Nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descrito en WO 04/041862 y/o que tienen una o más propiedades o características extrañas, en comparación con los Nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descritos en WO 04/041862.

Más en particular, un objetivo de la invención es proporcionar Nanocuerpos contra TNF-alfa, y para proporcionar

proteínas o polipéptidos que comprenden lo mismo, que están mejorados en comparación con los Nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descritos en WO 04/041862 con respecto a uno o más de las siguientes propiedades o características:

- 5 -afinidad aumentada por TNF-alfa, en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en un forma bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en WO 04/041862 o más adelante en la presente);
- mejor adecuación para dar formato en un formato multivalente (por ejemplo en una forma bivalente);
- mejor adecuación para formatear en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en WO 04/041862 o más adelante en la presente);
- 10 - mejor adecuación o sensibilidad para "humanizar" sustituciones (como se define en la presente); y/o
- menor inmunogenicidad, sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en una forma bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o más adelante en la presente) en un formato monovalente;
- 15 - estabilidad aumentada, sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en una forma bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en WO 04/041862 o más adelante en la presente) en un formato monovalente;
- especificidad aumentada hacia el TNF-alfa, sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en una forma bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo uno de los formatos multiespecíficos descritos en WO 04/041862 o más adelante en la presente) en un formato monovalente;
- 20 - disminución o cuando sea necesario aumento de la reactividad cruzada con TNF-alfa de diferentes especies;
- y/o
- una o más de otras propiedades mejoradas deseables para el uso farmacéutico (que incluye uso profiláctico y/o uso terapéutico) y/o para uso diagnóstico (que incluye pero sin limitación al uso para fines de examen por imágenes), sea en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo en una forma bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en WO 04/041862 o más adelante en la presente).
- 25

Estos objetos se obtienen por los Nanocuerpos, proteínas y polipéptidos descritos en la presente. Estos Nanocuerpos también se denominan en la presente como "*Nanocuerpos de la invención*"; y estas proteínas y polipéptidos también se denominan colectivamente en la presente "*polipéptidos de la invención*".

30 La invención se refiere a un nanocuerpo ("*nanocuerpo de la invención*") contra TNF-alfa que comprende cuatro regiones estructurales (FR1 a FR4) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3), en las que

A)

- i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y
- 35 iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

B)

i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY;

40 ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y

iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN, en que dicho nanocuerpo tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descritas en el Ejemplo I, bajo 3) de WO 04/041862 que es mejor de 5 nM.

45 Debido a que los Nanocuerpos y polipéptidos descritos en la presente, se consideran principalmente destinados al uso terapéutico y/o diagnóstico, ellos se dirigen contra (como se define en la presente) TNF-alfa humano. Sin embargo, no se excluye (pero tampoco se requiere) que los Nanocuerpos y polipéptidos descritos en la presente muestren reactividad cruzada con TNF-alfa de una o más especies de animales de sangre caliente, por ejemplo con TNF-alfa de una o más especies diferentes de primates y/o con TNF-alfa de una o más especies de animales que a menudo se usan en modelos animales para enfermedades (por ejemplo ratón, rata, conejo, cerdo o perro), y en particular en modelos

animales para enfermedades y trastornos asociados con TNF-alfa (tal como los modelos de especie y animal mencionados en la presente). En este aspecto, será evidente para los expertos que tal reactividad cruzada, cuando está presente, puede tener ventajas desde un punto de vista del desarrollo del fármaco, ya que permite analizar los Nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa humano en tales modelos animales.

5 Los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos y/o reivindicados en la presente se dirigen contra y/o pueden unirse a un epítopo de TNF-alfa que se halla en y/o forma parte del sitio de unión del receptor de TNF (por ejemplo, los sitios de unión para el TNF-RI, THF-RII, también conocido como p55 o p75). Como es bien conocido en la técnica, un trímero de TNF comprende tres sitios de unión al receptor, que son esencialmente equivalentes y que se forman por/en la interfaz de dos monómeros de TNF dentro de los trímeros TNF. Los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos y/o reivindicados en la presente preferentemente se dirigen contra y/o se unen a un epítopo de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos de TNF-alfa; Gln en la posición 88, Lys en la posición 90, y/o Glu en la posición 146).

Los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos y/o reivindicados en la presente preferentemente se dirigen contra y/o se unen a un epítopo del trímero TNF-alfa, que se halla en y/o forma parte del sitio de unión del receptor de TNF. Los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos y/o reivindicados en la presente se dirigen contra y/o pueden unirse a un epítopo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 y Lys en la posición 90 en un primer monómero de TNF (denominado en la presente como "monómero A"), y Glu en la posición 146 en un segundo monómero de TNF (denominado en la presente como "monómero B") (en que el Monómero A y Monómero B juntos, en el trímero TNF, forma el sitio de unión del receptor de TNF).

20 Más particularmente, los Nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en la presente se pueden dirigir contra y/o se pueden unirse a un epítopo del trímero de TNF-alfa que comprende los aminoácidos anteriormente mencionados (Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B), y además al menos uno, 0 preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa: Gly en las posiciones 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Leu en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91. Asn en la posición 92, Ile en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20. Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 115, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

Tal epítopo se puede delinear a partir del análisis estructural del nanocuerpo cristalizado en el complejo con la molécula de TNF, o de otros métodos tales como mapeo genético por medio del análisis pepscan.

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

Los dominios variables de la inmunoglobulina dirigidos contra el epítopo anterior son Nanocuerpos, en tal caso las proteínas y polipéptidos que comprenden Nanocuerpos también se pueden describir adicionalmente en la presente.

En consecuencia, algunos aspectos preferidos de la invención descritos y/o reivindicados en la presentes se refieren a:

40 I) Un Nanocuerpo que se dirige contra el mismo epítopo en el trímero de TNF-alfa como Nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52).

II) Un Nanocuerpo que se dirige contra el mismo epítopo en el trímero de TNF-alfa como Nanocuerpo TNF3 (SEQ ID NO: 60).

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

IV). Un Nanocuerpo que se dirige contra un epítopo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que además comprende al menos comprende al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa: Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91. Asn en la posición 92, Ile en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 115, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

- V) Un Nanocuerpo que se dirige contra un epítipo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 del monómero B; y que además comprende al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, los siguientes residuos de aminoácidos de monómero A de TNF-alfa:
- 5 Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en las posiciones 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, Ile en la posición 97, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137 y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición 33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de 1) a V) anterior, que tiene una tasa de K_{off} para TNF mejor de $2 \cdot 10^{-3}$ (l/s), preferentemente mejor de $1 \cdot 10^{-3}$.
- 10 Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de células KYM descritas en el Ejemplo I, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de células KYM descritas en el Ejemplo 1, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- 15 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de 1) a V) anterior, que es un Nanocuerpo humanizado.
- y algunos aspectos preferidos de esta realización se refieren a:
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que es un Nanocuerpo clase GLEW.
- 20 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que es Nanocuerpo clase GLEW humanizado.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103, y que está humanizado.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que es un Nanocuerpo de clase GLEW y que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103, y que está humanizado.
- 25 Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NOs 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (NT30)
- 30 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
- 35 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR3, comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que:
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN;
- 40 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 45 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o

5 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;

y en que:

b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácidos de EINTNGLITKYPDSVKG; o

10 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;

15 y en que

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

20 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

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

- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY.

25 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.

- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN

- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que:

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

30 - CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN

- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

35 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, en que

- cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido; y/o

- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos.

y algunas otros aspectos preferidos de esta realización se refieren a:

40 - Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que es Nanocuerpo clase KERE

- Un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, que es Nanocuerpo clase KERE humanizado

y con aún otros aspectos particularmente preferidos que son:

- VI) Una proteína o polipéptido, que comprende a o consiste esencialmente en un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior,
- VII) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanocuerpo de acuerdo con alguno de I) a V) anterior.
- 5 VIII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior.
- IX) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor TNF que está mediado por dicho trímero TNF y/o la transducción de señales que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.
- 10 X) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que es capaz de realizar la unión intramolecular en al menos dos sitios de unión del receptor TNF en un trímero de TNF.
- XI) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, unido por medio de un ligador adecuado.
- 15 XII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, unido por medio de un ligador adecuado, y que está pegilado.
- XIII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
- XIV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señales que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.
- 20 XV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana y que es capaz de realizar la unión intramolecular en al menos dos sitios de unión del receptor TNF en un trímero TNF.
- 25 XVI) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que cada uno de los dos Nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
- 30 XVII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que cada uno de los dos Nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señales que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.
- 35 XVIII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior, y que además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que cada uno de los dos Nanocuerpos de acuerdo con alguno de I) a V) anterior está ligado, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es capaz de realizar la unión intramolecular en al menos dos sitios de unión del receptor TNF en un trímero de TNF.
- 40 XIX) Una proteína o polipéptido de acuerdo alguno de VI) a XVIII) anterior, en que al menos un Nanocuerpo dirigido contra la albúmina sérica humana es un Nanocuerpo humanizado.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo alguno de VI) a XVIII) anterior, en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).
- 45 - Una proteína o polipéptido de acuerdo alguno de VI) a XVIII) anterior, en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige de un grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALE 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102) ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de acuerdo alguno de VI) a XVIII) anterior, en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra la albúmina sérica humana es ALB 8.
- 50 - Una proteína o polipéptido de acuerdo alguno de VI) a XVIII) anterior, que comprende o consiste esencialmente en dos humanizados Nanocuerpos de acuerdo con I) a V) anterior, y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID

NO: 63).

Cabe mencionar que cuando un Nanocuerpo se menciona anteriormente como "*de acuerdo con cualquiera de I) a V) anterior*", está al menos de acuerdo con uno de 1) a V), puede estar de acuerdo con dos o más de I) a V), y también pueden incluir alguno o más de los otros aspectos que se indican como que están "*de acuerdo con alguno de I) a V) anterior*".

De modo similar, cuando una proteína o polipéptido se menciona anteriormente como ser "*de acuerdo con cualquiera de VI) a XVIII) anterior*", es al menos de acuerdo con uno de VI) a XVIII), puede estar de acuerdo con dos o más de VI) a XVIII), y también puede incluir alguno o más de los otros aspectos que se indican como que están "*de acuerdo con cualquiera de VI) a XVIII) anterior*".

También está dentro del alcance de la invención que, cuando sea aplicable, un polipéptido de la invención se puede unir a dos o más determinantes antigénicos, epitopes, partes, dominios, subunidades o conformaciones de TNF-alfa. En tal caso, los determinantes antigénicos, epitopes, partes, dominios o subunidades de TNF-alfa al que se unen los polipéptidos de la invención pueden ser esencialmente iguales (por ejemplo, si TNF-alfa contiene motivos estructurales repetidos o está presente como un multímero) o puede ser diferente (y en este último caso, los polipéptidos de la invención se pueden unir a estos diferentes determinantes antigénicos, epitopes, partes, dominios, subunidades de TNF-alfa con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual o diferente). Asimismo, por ejemplo, cuando TNF-alfa existe está en una conformación activada y en una conformación inactiva, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden unirse a una de estas conformaciones o puede unir a ambas conformaciones (es decir con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual o diferente). Asimismo, por ejemplo, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a una conformación de TNF-alfa en que esta se une a un ligando pertinente, se puede unir a una conformación de TNF-alfa en que esta no se une a un ligando pertinente, o se puede unir a tales conformaciones (nuevamente con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual o diferente).

También se espera que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención generalmente se unirán a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos naturales o sintéticos de TNF-alfa, o al menos a los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de TNF-alfa que contienen uno o más determinantes antigénicos o epitopes que son esencialmente los mismos que el determinante antigénico o epitope al que se unen los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención en TNF-alfa (por ejemplo en TNF-alfa). Nuevamente, en tal caso, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a tales análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que son las mismas o diferentes de (es decir mayor de o menor de) la afinidad y especificidad con la que los Nanocuerpos de la invención se unen a TNF-alfa (tipo salvaje). También se incluyen dentro del alcance de la invención que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se unan a algunos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de TNF-alfa; pero no a otras.

En general, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se unirán al menos a estas formas (que incluyen formas monoméricas, multiméricas y asociadas) que son las más relevantes de un punto de vista biológico y/o terapéutico, tal como será evidente para los expertos.

Asimismo, debido a que TNF-alfa existe en una forma monomérica y en formas multiméricas, y en particular en forma trimérica, está dentro del alcance de la invención que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención solo se unan a TNF-alfa en la forma monomérica, o que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención además también se unen a una o más de estas formas multimérica, tales como la forma trimérica de TNF, o solo se pueden unir a tal forma multimérica (por ejemplo trimérica). En consecuencia, generalmente cuando en esta descripción, se hace referencia a un Nanocuerpo, proteína o polipéptido que se dirige a TNF-alfa, se debe entender que esta también comprende los Nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa en su forma trimérica (que incluyen pero sin limitación los Nanocuerpos contra los sitios de unión al receptor (por ejemplo los sitios de unión para el TNF-RI, TNF-RIII, también conocido como p55 o p75) de tal trímero). En todos los casos, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a tales multímeros o complejos de proteína asociada con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual como o diferente de (es decir mayor de o menor de) la afinidad y/o especificidad con que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se unen a TNF-alfa en sus estado monomérico y no asociado.

Asimismo, generalmente, los polipéptidos de la invención que contienen dos o más Nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa se pueden unir con mayor avidez que los correspondientes Nanocuerpo o Nanocuerpos monoméricos.

Por ejemplo, y sin limitación, una proteína o polipéptido multivalente (como se define en la presente) que contiene dos o más Nanocuerpos que se dirigen contra epitopes diferentes de TNF-alfa proteína o polipéptido multivalente (como se define en la presente) que contiene dos o más Nanocuerpos que se dirigen contra diferentes epitopes de TNF-alfa se puede unir a TNF-alfa con avidez más altas que los correspondientes monómeros.

De modo más importante, una proteína o polipéptido multivalente (como se define en la presente) que contiene dos o más Nanocuerpos que se dirigen contra TNF-alfa pueden (y usualmente) se unen con mayor avidez a un multímero de TNF-alfa que a un monómero of TNF-alfa, y usualmente también se unirán con mayor avidez que los correspondientes

Nanocuerpos monoméricos. En tal proteína o polipéptido multivalente, dos o más Nanocuerpos por ejemplo se pueden dirigir contra los mismos epitopes, epitopes sustancialmente equivalentes, o epitopes diferentes. En una realización de

tal proteína o polipéptido multivalente, los dos o más Nanocuerpos pueden ser iguales (y en consecuencia se dirige contra el mismo epítipo).

5 Esta última es de particular importancia, ya que se sabe que el modo de primario de transducción de señal por parte de TNF involucra el entrecruzamiento por receptores TNF por un trímero de moléculas TNF, que contiene tres sitios de unión al receptor (ver por ejemplo Peppel et al., J. Exp. Med., 174 (1991), 1483-1489; Engelmann et al., J. Biol. Chem., 265 (1990), 14497; Smith y Baglioni, J. Biol. Chem., 264 (1989), 14646). Por ejemplo, como se describe por Peppel et al., un dominio extracelular monovalente manipulado genéticamente del receptor TNF – que fue solo capaz de bloquear un sitio de unión al receptor único en un trímero de TNF – fue incapaz de evitar el entrecruzamiento de los receptores TNF con los dos sitios de unión al receptor restantes; mientras que una proteína manipulada genéticamente que comprende dos de estos dominios extracelulares – en consecuencia que son capaces de bloquear dos sitios de unión al receptor – proporcionaron una eficacia notable en comparación con el dominio extracelular monovalente.

10 En la presente invención, se ha hallado que los Nanocuerpos monovalentes son capaces de unirse a TNF alfa de manera tal que se reduce la actividad de TNF, tanto en los modelos in vitro, como los modelos celulares y en los modelos ex vivo (ver la siguiente sección Experimental). Si bien la invención no se limita a ningún mecanismo, explicación o hipótesis específica, se considera que debido a su tamaño pequeño y alta afinidad por TNF-alfa, dos o tres Nanocuerpos monovalentes de la invención son capaces de ocupar simultáneamente dos o tres sitios de unión diferentes al receptor sobre el trímero TNF, en consecuencia se evita que el trímero inicie el entrecruzamiento del receptor y de este modo inicie la transducción de señal (sin embargo, otros mecanismos de acción no se excluyen: por ejemplo, de acuerdo con el epítipo contra el cual se dirige, un Nanocuerpo de la invención también puede inhibir la asociación del TNF en el estado trimérico).

15 También se debe indicar que, en forma adicional o alternativa a la unión a dos o más sitios de unión al receptor en un trímero de TNF único, las proteínas o polipéptidos de la presente invención que comprenden o consisten esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de este) que se dirigen contra epítopos de TNF-alfa pueden unir (por ejemplo, en forma intermolecular) los epítopos de dos moléculas de TNF-alfa separadas (por ejemplo dos trímeros separados).

20 Sin embargo, de acuerdo con una realización particularmente preferida, la invención se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de estos) que se dirigen contra los epítopos en las TNF-alfa (y en particular del trímero TNF-alfa) que se halla y/o forma parte del sitio de unión al receptor del trímero TNF, de modo que dicho polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.

25 En particular, de acuerdo con esta preferida realización, la invención se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de este) que se dirigen contra los epítopos sobre la TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa) que se halla en y/o forman parte del sitio de unión al receptor del Trímero de TNF-alfa, en los que dichos dominios variables de inmunoglobulina se ligan entre sí de modo tal que la proteína o polipéptido es capaz de unirse simultáneamente a dos o más sitios de unión al receptor en un trímero de TNF único (en otras palabras, es capaz de realizar la intramolecular en al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero TNF). En esta realización, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina son preferentemente Nanocuerpos (de modo que la proteína o polipéptido es un constructo de Nanocuerpo multivalente, como se describe adicionalmente en la presente). Asimismo, en esta realización, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina pueden ser iguales o diferentes; y se pueden dirigir contra epítopos diferentes dentro del sitio de unión al receptor de TNF, pero preferentemente se dirigen contra el mismo epítipo.

30 En un aspecto preferido de esta realización, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina se dirigen contra epítopos del trímeros de TNF-alfa, estos epítopos se hallan en y/o forman parte del sitio de unión al receptor del TNF(s). Por ejemplo, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina preferentemente se dirigen contra y/o se pueden unir al epítipo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 y Lys en la posición 90 en el primer monómero de TNF (denominado en la presente como "monómero A"), y Glu en la posición 146 en un segundo monómero de TNF (denominado en la presente como "monómero B") (en que el Monómero A y Monómero B juntos, en el trímero de TNF, forman el sitio de unión al receptor del TNF).

35 Como se describe adicionalmente más adelante con más detalle con respecto a los Nanocuerpos, en tal proteína o polipéptido, al menos dos dominios variables de inmunoglobulina se une preferentemente de manera tal que la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de los dos dominios variables de inmunoglobulina presentes en tal proteína o polipéptido, es preferentemente al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y más preferentemente en la región de Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom.

40 En un aspecto particularmente preferido de esta realización, estas dos o más secuencias de inmunoglobulina son Nanocuerpos, y preferentemente se eligen de los Nanocuerpos descritos en la presente. Algunos Nanocuerpos particularmente preferidos para usar en esta realización de la invención son PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO:52) y/o PMP5F10 (TNF3, SEQ ID NO: 60), así como sus variantes humanizadas y otras (que se describen en la presente); con

PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO:52) y sus variantes humanizadas son particularmente preferidas.

Por consiguiente, la presente realización se describirá a continuación con más detalle con referencia a los Nanocuerpos. Sin embargo, será evidente para los expertos que las enseñanzas de la presente se pueden aplicar en forma análoga a los dominios variables de inmunoglobulina, con la condición de que al menos uno de dichos dominios sea un Nanocuerpo descrito en la presente.

In esta realización de la invención, las dos o más secuencias de inmunoglobulina usualmente se unirán por medio de uno o más ligadores adecuados, tales ligadores son de modo tal que cada secuencia de inmunoglobulina se puede unir a un sitio de unión al receptor diferente en el mismo trímero de TNF. Los ligadores adecuados dependerán entre otros de (la distancia entre) los epitopes del trímero de TNF al que se unen las secuencias de inmunoglobulina, y será evidente para los expertos sobre la base de la descripción de la presente, opcionalmente después de algún grado limitado de experimentación de rutina. Por ejemplo, cuando las dos o más secuencias de inmunoglobulina son dominio (único) de los anticuerpos o Nanocuerpos (único), los ligadores adecuados se pueden elegir de los ligadores que se describen en la presente, pero con una longitud del ligador que es tal que los dos o más anticuerpos o Nanocuerpos de dominio (único) se pueden unir a diferentes sitios de unión al receptor en el mismo trímero de TNF.

Asimismo, cuando los dos o más secuencias de inmunoglobulina que se unen a los sitios de unión al receptor de TNF-alfa son dominio (único) de los anticuerpos o Nanocuerpos, ellos se pueden ligar entre sí por medio de un tercer dominio (único) del anticuerpo o Nanocuerpo (en que dos o más secuencias de inmunoglobulina se pueden unir directamente al tercer dominio (único) del anticuerpo o Nanocuerpo o por medio de ligadores adecuados). Tal tercer dominio (único) del anticuerpo o Nanocuerpo por ejemplo pueden ser un dominio (único) del anticuerpo o Nanocuerpo que proporciona un aumento de la vida media, que también se describe en la presente. Por ejemplo, este último dominio (único) del anticuerpo o Nanocuerpo puede ser un dominio (único) del anticuerpo o Nanocuerpo que es capaz de unirse a una proteína sérica (humana) tal como albúmina sérica (humana), que también se describe en la presente.

Alternativamente, las dos o más secuencias de inmunoglobulina que se unen al sitio de unión al receptor de TNF-alfa se pueden unir en serie (sea directamente o por medio de un ligador adecuado) y el tercer dominio (único) del anticuerpo o Nanocuerpo (que puede proporcionar aumento de la vida media, como se describió antes) se puede conectar en forma directa o por medio de un ligador a uno de estos dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas anteriormente. Algunos ejemplos no limitantes de tales constructos son los constructos de la SEQ ID) NOS: 93 o 94.

En particular, se ha hallado en la invención (ver los datos cristalográficos mencionados en la presente) que, cuando los Nanocuerpos presentes en una proteína o polipéptido de la invención multivalente o multiespecífico se une al epitope particular que se describió anteriormente (que es el epitope de TNF1 y sus variantes humanizadas, así como TNF3 y sus variantes humanizadas) luego preferentemente, los dos (o más) Nanocuerpos anti-TNF presentes en tal proteína o polipéptido se deben unir de modo tal que la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos Nanocuerpos anti-TNF presentes en tal proteína o polipéptido preferentemente deber ser al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom (con el límite superior que es menos crítico, y se elige por razones de conveniencia, por ejemplo con una vista a la expresión/producción de la proteína); o más generalmente que dicha distancia debe ser tal que permite a la proteína o polipéptido experimentar la unión intramolecular al trímero de TNF (es decir en cambio de la unión intermolecular). La distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos Nanocuerpos anti-TNF se puede determinar por cualquier medio adecuado, tal como por cristalografía o modelado molecular (como se describe en la presente). Estas técnicas generalmente permiten determinar si una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífica específica es capaz de proporcionar el modelado intramolecular.

Alternativamente, la presente invención también proporciona un experimento simple por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (descrito por Santora et al., Anal. Biochem., 299: 119-129) que se puede usar para determinar si una proteína o polipéptido determinado de la invención proporcionará (predominantemente) unión intramolecular a un trímero de TNF o (predominantemente) unión intermolecular entre dos o más trímeros de TNF-alfa. En consecuencia, en una realización particular de la invención, una proteína o polipéptido de la invención preferentemente es tal que en este experimento, en forma predominante o esencial y exclusivamente produce la unión intramolecular. Sin embargo, como se destacó anteriormente, cabe mencionar que las proteínas o polipéptidos de la invención que operan por medio de unión intermolecular de moléculas TNF-alfa separadas (por ejemplo trímeros) también están dentro del alcance de la presente invención.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífica que comprende al menos dos Nanocuerpos contra TNF-alfa (y en particular del trímero TNF-alfa), en que dichos Nanocuerpos preferentemente se dirigen a esencialmente el mismo epitope que el Nanocuerpo PMP1C2 (como se menciona en la presente), y en que dichos al menos dos Nanocuerpos se unen de modo que el tiempo de distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de al menos dos Nanocuerpos anti-TNF es tal que la proteína o polipéptido es capaz de experimentar unión intramolecular (como se describe en la presente) con un trímero de TNF-alfa. Preferentemente, en tal proteína o polipéptido, la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos Nanocuerpos anti-TNF es al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom.

En tal proteína o polipéptido de preferencia, los dos o más Nanocuerpos se pueden unir de cualquier modo adecuado, siempre que se puede obtener la distancia preferida entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de al menos dos Nanocuerpos anti-TNF, y/o siempre que la proteína o polipéptido sea capaz de experimentar la unión intramolecular (como se describe en la presente) con un trímero de TNF-alfa.

5 Por ejemplo, en su forma más simple, al menos dos Nanocuerpos se unen directamente por medio de un ligador o espaciador adecuado que proporciona la distancia preferida entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del al menos dos Nanocuerpos anti-TNF y que pueden permitir que la proteína o polipéptido experimente la unión intramolecular (como se describe en la presente) con un trímero de TNF. Los ligadores adecuados se describen en la presente, y pueden - por ejemplo y sin limitación - comprender una secuencia de aminoácidos, tal secuencia de
10 aminoácidos preferentemente tiene una longitud de 14 aminoácidos, más preferentemente al menos 17 aminoácidos, tal como aproximadamente 20-40 secuencia de aminoácidos (que, usando una distancia promedio de 3,5 Angstrom para un aminoácido, corresponde a las longitudes del ligador de 49 Ångstrom, 59,5 Ångstrom y aproximadamente 70 Ångstrom, respectivamente; la máxima cantidad de aminoácidos se calcula de la misma manera sobre la base de las distancias mencionadas anteriormente). Preferentemente, tal secuencia de aminoácidos también debe ser tal que
15 permita que la proteína o polipéptido experimente la unión intramolecular (como se describe en la presente) con un trímero de TNF-alfa,

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona una proteína o polipéptido multivalente o multispecifica que comprende al menos dos Nanocuerpos contra TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa), en que dichos Nanocuerpos preferentemente se dirigen a esencialmente el mismo epítipo que el Nanocuerpo PMP1C2 (como se
20 menciona en la presente), y en que dichos al menos dos Nanocuerpos se unen directamente entre sí por medio de un ligador o espaciador adecuado de modo que la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de al menos dos Nanocuerpos anti-TNF es tal que la proteína o polipéptido es capaz de experimentar la unión intramolecular (como se describe en la presente) con un trímero de TNF. Preferentemente, en tal proteína o polipéptido, la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos Nanocuerpos anti-TNF (y de este modo la longitud preferida del ligador o espaciador) es al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom.

Más preferentemente, en este aspecto preferido, el ligador o espaciador es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 14, preferentemente al menos 17, más preferentemente al menos 20 aminoácidos (con un límite superior no crítico elegido por razones de conveniencia que es aproximadamente 50, y preferentemente
30 aproximadamente 40 aminoácidos). En una realización preferida, pero no limitante, el ligador consiste esencialmente en residuos de serina y glicina (que también se describe a continuación). Por ejemplo, un ligador adecuado es el ligador GS30 que se describe en la presente, que comprende 30 residuos de aminoácido.

En otra realización, el al menos dos Nanocuerpos contra TNF-alfa se ligan entre sí por medio de otro resto (opcionalmente por medio de uno o dos ligadores), tal como otra proteína o polipéptido. En esta realización, puede ser
35 conveniente tener la distancia preferida (es decir, como se mencionó anteriormente) entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de al menos dos Nanocuerpos anti-TNF, por ejemplo, de modo que la proteína o polipéptido todavía pueden experimentar unión intramolecular (como se describe en la presente) con un trímero de TNF. En esta realización, los al menos dos Nanocuerpos se pueden ligar directamente al otro residuo, o usar un ligador o espaciador adecuado, nuevamente siempre que aún se pueda lograr la distancia preferida y/o unión intramolecular deseada. El residuo puede ser cualquier residuo adecuado que no distraiga (demasiado) de la unión de la proteína o polipéptido al TNF y/o de las propiedades biológicas o farmacológicas deseadas de la proteína o polipéptido. Como tal, el residuo puede ser esencialmente inactivo o puede ser biológicamente activo, y como tal puede o no mejorar las propiedades deseadas de la proteína o polipéptido y/o pueden conferir una o más propiedades deseadas adicionales a la proteína o polipéptido. Por ejemplo, y sin limitación, el resto puede aumentar la vida media de la proteína o polipéptido, y/o puede
40 reducir su inmunogenicidad o mejorar cualquier otra propiedad deseada.

En una realización preferida, el resto puede ser otro Nanocuerpo (que incluye pero sin limitación un tercer Nanocuerpo contra TNF-alfa, si bien esto no es necesario y usualmente menos preferido), y en particular otro Nanocuerpo que mejora la vida media de la proteína o polipéptido, tal como un Nanocuerpo que se dirige contra una proteína sérica, por ejemplo contra albúmina sérica humana. Los ejemplos de tales proteínas y polipéptidos se describen en la presente.

50 En consecuencia, en una realización, la invención se refiere a un constructo de multivalente multispecifico que comprende dos o más secuencias de inmunoglobulina (o sus fragmentos adecuados) que se dirigen contra epítopos en TNF-alfa (por ejemplo del trímero de TNF-alfa) que se halla en y/o forma parte del sitio de unión al receptor, y que se unen entre sí por medio de al menos una secuencia de inmunoglobulina que proporciona aumento de la vida media (y opcionalmente por medio de uno o más ligadores adecuados), de modo que dicho polipéptido, después de la unión al
55 trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF y/o la transducción de señal que es mediada por dicho trímero de TNF. Tal polipéptido puede ser tal que dichas dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas primero se pueden unir a un diferente sitio de unión al receptor en un trímero de TNF.

En particular, en esta realización, el polipéptido puede comprender un nanocuerpo biespecifico trivalente, que comprende dos Nanocuerpos que se dirigen contra epítopos sobre TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa) que se halla en y/o forma parte del sitio de unión al receptor, en que dichos Nanocuerpos se unen entre sí por medio de un
60

tercer Nanocuerpo que proporciona un aumento de la vida media (por ejemplo un Nanocuerpo que se dirige a una proteína sérica tal como albúmina sérica humana), en que cada uno de los dos Nanocuerpos mencionados primero se pueden unir directamente a dicho tercer Nanocuerpo o por medio de uno o más ligadores adecuados, de modo que dicho polipéptido, después de la unión a un trímero TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF y/o la transducción de señales que está mediada por dicho trímero de TNF. Tal polipéptido puede ser tal que dichos dos Nanocuerpos mencionados primero se pueden unir a diferentes sitios de unión al receptor en un trímero de TNF. Nuevamente, algunos Nanocuerpos particularmente preferidos para usar en esta realización de la invención son PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO:52) y/o PMP5F10 (TNF3, SEQ ID NO: 60), así como variantes humanizadas y otras (como se describe en la presente); con PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO:52) y sus variantes humanizadas son particularmente preferidas; y los Nanocuerpos dirigidos contra albúmina sérica humana descritos en la presente. Algunos constructos preferidos, pero no limitantes de esta realización de la invención son TNF 24 (SEQ ID NO: 90), TNF 27 (SEQ ID NO: 93), y TNF 60 (SEQ ID NO; 417) de los cuales TNF 60 es particularmente preferido. En consecuencia, algunos aspectos preferidos de esta realización de la invención se refieren a:

XIX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de la inmunoglobulina (o sus fragmentos adecuados) que se dirigen contra epitopes sobre el trímero TNF-alfa (y en particular del trímero TNF-alfa) que se halla en y/o forma parte del sitio de unión al receptor(s) del trímero de TNF, de modo que dicho polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el Entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero TNF y/o

la transducción de señal que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.

XX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de la inmunoglobulina (o sus fragmentos adecuados) que se dirigen contra epitopes sobre TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa) que se halla en y/o forma parte del sitio de unión al receptor(s) del trímero de TNF, de modo que dicho polipéptido es capaz de experimentar unión intramolecular en al menos dos sitios de unión al receptor de TNF sobre un trímero de TNF.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dichos dominios variables de la inmunoglobulina se unen entre sí de manera tal que la proteína o polipéptido es capaz de unirse en forma simultánea a dos o más sitios de unión al receptor en trímero de TNF único.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dichos dominios variables de la inmunoglobulina son capaces de unirse al mismo epitope que el Nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52).

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dichos dominios variables de la inmunoglobulina son capaces de unirse contra el epitope dentro del sitio de unión al receptor del TNF del trímero de TNF que al menos comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dichos dominios variables de la inmunoglobulina son capaces de unirse contra el epitope dentro del sitio de unión al receptor del TNF del trímero de TNF que al menos comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 como monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que además comprende al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa: Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, He en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91. Aso en la posición 92, Ile en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asa en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 1.15, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de unirse contra el epitope dentro del sitio de unión al receptor del TNF del trímero de TNF que al menos comprende los siguientes residuos de aminoácidos: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que además comprende al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más y preferentemente todos o esencialmente todos, los siguientes residuos de aminoácidos del monómero A de TNF-alfa, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, Ile en la posición 97, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137 y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición 33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que al menos dos dominios variables de inmunoglobulina se unen de modo que la distancia entre el extremo N-terminal del primer dominio variable de la inmunoglobulina y el extremo C-terminal del segundo dominio variable de la inmunoglobulina presente en tal proteína o

polipéptido es al menos 50 Ångstrom.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que la distancia entre el extremo N-terminal primer dominio variable de la inmunoglobulina y el extremo C-terminal del segundo dominio variable de la inmunoglobulina esta entre 55-200 Ångstrom
- 5 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que la distancia entre el extremo N-terminal del primer dominio variable de la inmunoglobulina y el extremo C-terminal del segundo dominio variable de la inmunoglobulina está entre 65-150 Ångstrom
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominio variable de la inmunoglobulina se unen entre sí por medio de un ligador o espaciador.
- 10 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el ligador o espaciador es una secuencia de aminoácidos.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el ligador o espaciador comprende al menos 14 residuos de aminoácidos.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el ligador o espaciador comprende al menos 17 - 50 residuos de aminoácidos.
- 15 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el ligador o espaciador consiste esencialmente en residuos de serina y glicina.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el ligador o espaciador GS30 (SEQ ID NO: 69).
- 20 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominio variable de la inmunoglobulina se unen entre sí por medio de otro resto.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dicho otro resto es resto de proteína o polipéptido.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dicho otro resto confiere al menos una propiedad deseada a la proteína o polipéptido, o mejora al menos una propiedad deseada de la proteína o polipéptido.
- 25 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que dicho otro resto aumenta la vida media de la proteína o polipéptido y/o reduce la inmunogenicidad de la proteína o polipéptido.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que cada una del primer y segundo dominio variable de la inmunoglobulina se unen a dicho otro resto por medio de un ligador o espaciador.
- 30 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el ligador o espaciador es una secuencia de aminoácidos.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el ligador o espaciador consiste esencialmente en residuos de serina y glicina.
- 35 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el dicho otro resto es un Nanocuerpo.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el otro resto es un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un Nanocuerpo humanizado.
- 40 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB I (SEQ ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige de un grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102) ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).
- 45 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con una tasa de K_{off} para TNF mejor que $2 \cdot 10^{-3}$ (1/s), preferentemente mejor de $1 \cdot 10^{-3}$ (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.,
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descritas en el Ejemplo I, bajo 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del Nanocuerpo V_{HH} E (SEQ ID NO:4) del documento WO 04/041862 del mismo ensayo; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de células KY descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 12 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de células KYM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de células KYM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos de acuerdo con cualquier de XIX) a XX) anterior, que están humanizados;
- algunos aspectos particularmente preferidos de esta realización son:
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos clase GLEW.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con un residuo de arginina (R) en la posición 103.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos clase GLEW con un residuo de arginina (R) en la posición 103.
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos con al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (TNF30)
 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos que se describen para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que:
 - a) CDR1 comprende:
 - secuencia de aminoácidos DYWMY; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
 - y
 - b) CDR2 comprende:
 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 5 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;
- c) CDR3 comprende:
 - la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 15 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior, en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
- 20 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que:
- 25 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 30 -CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 35 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 40 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que
- a) CDR1 es:
 - la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
 - 45 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- y en que:
- b) CDR2 es:

- la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
 - 5 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;
- y en que
- c) CDR3 es:
- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo t diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 15 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
- 20 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que:
- 25 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- 30 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 35 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos descritos para las proteínas o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) en que:
- 40 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido; y/o
- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina se eligen del grupo que consiste en el nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52) y variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 1 (SEQ ID NO: 52).
- 45 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina. se eligen del grupo que consiste en T13 (SEQ ID NO: 76), TNF 14 (SEQ ID NO: 77), TNF 29 (SEQ ID NO: 95) y TNF 30 (SEQ ID NO:96).

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son TNF 30 (SEQ ID N0:96);

y algunos aspectos particularmente preferidos de esta realización son:

5 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX), en que el primer y segundo dominios variables de la inmunoglobulina son Nanocuerpos clase KERE.

Cabe destacar que cuando una proteína o polipéptido se mencionó anteriormente como que está "de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior", está al menos de acuerdo con XIX) a XX), y puede estar de acuerdo con ambos XIX) y XX), y también puede incluir alguno o más de otros aspectos que se indican como que están "de acuerdo con cualquiera de XIX) a XX) anterior".

10 Sin embargo, cabe mencionar que la invención no está limitada a cualquier mecanismo específico de acción o hipótesis. En particular, se ha hallado que los Nanocuerpos monovalentes de la invención también pueden ser activos en los ensayos y modelos descritos en la presente, que confirman la unión intramolecular del trímero de TNF, si bien se prefiere en una realización específica de la invención, no se requiere para obtener la acción deseada y efecto de los Nanocuerpos, proteínas y polipéptidos descritos en la presente. De modo similar, también está comprendido dentro del
15 alcance de la invención que las proteínas y polipéptidos que se describen en la presente obtienen acción deseada por medio de cualquier mecanismo apropiado (es decir, por unión intramolecular, unión intermolecular o incluso por unión a TNF monomérico, de este modo se inhibe la formación de TNF (trímeros).

También está dentro del alcance de la invención para usar partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, y/o para usar proteínas o polipéptidos que comprenden o
20 consisten esencialmente en los mismos, siempre que sean adecuados para los usos previstos en la presente. Tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos, derivados, proteínas y/o polipéptidos se describirán en la descripción adicional de la presente.

Los Nanocuerpos contra TNF-alfa descritos anteriormente y como se describen también más adelante en la presente también se denominan en la presente como Nanocuerpos de la invención.

25 La siguiente Tabla I lista las CDR y secuencias estructurales que están presentes en PMP1C2 (TNF1), un nanocuerpo de acuerdo con la invención.

Tabla 1: Combinaciones preferidas de secuencias estructurales y CDR (PMP1C2 es un nanocuerpo de acuerdo con la invención)

Clon	FRI		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1
PMP1C2 (TNF1)	3	QVQLVESGGGLVQPG	6	DYWMY	6	WVROAPGKG	3	EINTNGLITKYP	6	RFTISRDNKNTLYLQMNLSL	0	SPSGFN	3	RGQGT
	0	GSLRLSCAASGRTFS	4		8	LEWVS	2	DSVKG	6	KPEDTALYYCAR	0		4	QVTVSS
PMP1G11	3	QVQLVESGGGMVQPG	6	VSWMY	9	WVROAPGKG	3	EINTNGLITKYP	6	RFTISRDNKNTLYLQMNLSL	0	SPSGSF	3	RGQGT
	1	GSLRLSCAASGDFG	5		9	LEWVS	3	DSVKG	7	KPEDTALYYCAR	1		5	QVTVSS
PMP1H6	3	EVQLVESGGGLVQPG	6	VSWMY	2	WVROAPGKG	3	EINTNGLITKYV	6	RFTISRDNKNTLYLQMNLSL	0	SPSGSF	3	RGQGT
	2	GSLRLSCAATSGDFDS	6		0	LEWVS	4	DSVKG	8	KPEDTALYYCAR	2		6	QVTVSS
PMP1G5 (TNF2)	3	QVQLVESGGGLVQAG	6	EPFSGYT	2	WFRQAPGKE	3	RIYWSSGLTYY	6	RFTISRDIKNTVDLLMNNLSL	0	RDGIFTSRSV	3	WGQGT
	3	GSLRLSCAASGRTFS	7	YTIG	1	REFVA	5	ADSVKG	9	KPEDTAVYYCAA	3	GSYNY	7	QVTVSS
PMP1H2	3	QVQLVESGGGLVQPG	8	DYSGYT	2	WFRQAPGKE	3	RIYWSSGNTYY	7	RFTISRDIKNTVDLLMNNLSL	0	RDGIFTSRSV	3	WGQGT
	4	DSLRLSCAASGRTFS	6	YTVG	2	REFVA	6	ADSVKG	0	EPEDTAVYYCAA	4	ESYNY	8	QVTVSS
PMP3G2	3	AVQLVESGGGLVQPG	6	DYSGYT	2	WFRQAPGKE	3	RIYWSSGNTYY	7	RFTISRDIKNTVDLLMNNLSL	0	RDGIFTSRSV	3	WGQGT
	5	DSLRLSCAASGRTFS	9	YTVG	3	REFVA	7	ADSVKG	1	EPEDTAVYYCAA	5	ESYNY	9	QVTVSS
PMP1D2	3	AVQLVDSGGGLVQAG	7	AHSVYT	2	WFRQAPGKE	3	RIYWSSANTYY	7	RFTISRDNKNTVDLLMNNLSL	0	RDGIFTSRSV	4	WGQGT
	6	GSLRLSCAASGRTFS	0	MG	4	REFVA	8	ADSVKG	2	KPEDTAVYYCAA	6	EAYNY	0	QVTVSS

Tabla 1 (continuación):

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	1 D	1 D	1 D	1 D	1 D	1 D	1 D
PMP3D10	3 QVQLVESGGGLVQAGG 7 SLSLSCAASGRSFT	1 GYMG	2 WFRQAPG 5 KERQLLA	2 SISWRGNTYYKE 3 SVKG	2 RFTISRDDAKNTIYLOMN 3 SLKPEDTAVYYCAA	3 SILPLSDDPG 7 WNTN	3 WGQG 4 TQVTV 1 SS
PMP5F10 (TNF3)	3 EVQLVESGGGLVQAGG 8 SLSLSCAASGRSLS	2 NYMG	2 WFRQAPG 6 KERELLG	2 NISWRGNYIYKDS 4 VKG	2 RFTISRDDAKNTIYLOMN 4 RLKPEDTAVYYCAA	3 SILPLSDDPG 6 WNTY	3 WGQG 4 TQVTV 2 SS
NC55TNF ₋ S1C4	3 EVQLVESGGGLVQAGD 9 SLRLSCAASQIFG	3 SHVAA	2 WFRQAPG 7 REFEVA	2 EIRPSGDFGPEGE 1 FEHVTASLKG	2 RFTIAKNSVDNTIYLOMN 5 NSLKPEDTAVYYCAA	0 APYRGGRDYR 9 WEYEY	3 WGQG 4 TQVTV 3 SS
NC55TNF ₋ S1C3	4 EVQLVESGGGLVQPGG 0 SLRLSCKNAGSTSN	4 AYATG	2 WFRQAPG 8 KREFVA	2 GIQWSSGGDAFYRN 2 SVKG	2 RFRITRDPTNTIYLOMN 6 DLKPEDTAVYYCAA	1 KLSPPYNDFD 0 SSNYEY	3 WGQG 4 TQVTV 4 SS
NC55TNF ₋ S2C1	4 EVQLVESGGDLVQPGG 1 SLRLSCAVSQIFS	5 TNDVG	2 WYRRAPG 9 KQRELV	2 TIIDGGTIDYGD 3 VKG	2 RFVISREGEMVYLEMNS 7 LKPEDTAVYYCNI	1 NRLRSTWGIR 1 YDV	3 WGQG 4 TQVTV 5 SS
NC55TNF ₋ S2C5	4 EVQLVESGGGLVQPGG 2 SLRLSCVWSGFTFS	6 TTSMT	2 WVRQAPG 0 KFEWVS	2 FINSDGSSTIYADS 4 VKG	2 RFTISRDNKNTIYLOMN 8 SLKPEDTAVYYCGR	1 RGYGRD	3 RSGGI 4 QVTVA 6 S
NC55TNF ₋ S3C7	4 EVQLVESGGGTVDAGD 3 SLRLSCAASGRSFS	7 SVAMG	2 WFRQAPG 1 KQREFLA	2 GVGYDGSRIYAE 5 SVKG	2 RFTIARGNRESTVFLQMN 9 ENLKPEDTAVYFCTA	1 EPIGAYEGLW 3 TY	3 WGQG 4 TQVTV 7 SS

Tabla 1 (continuación):

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
NC55TNF_S3C1	1 TNF. 4 ALPHAVESGGGLMDFG 4 GSLKLSCAASGFMS	1 7 8	1 WFRQAPGK 2 EREFVA	2 4 6	2 TISWGGSS 8 SYADFVKG	1 3 4	3 WGQG 4 TQVTV 8 SS
NC55TNF_BMP1B2	1 4 EVQLVESGGGLVQAGG 5 SRLRSCAASGRITFG	1 7 9	1 WFRQAPGK 3 EREFVA	2 4 7	2 AISWGGGSIV 8 YAESAKG	1 5	3 WGQG 4 TQVTV 9 SS
NC55TNF_BMP1D2	1 4 EVQLVESGGELVQAGGS 6 LKLSCTASGRNFV	1 8 0	1 WFRAPGKE 4 REFVA	2 4 8	2 SISWGGDTT 8 YYSNSVKG	1 6	3 LGSGT 5 QVTVS 0 S
NC55TNF_BMP1E2	1 4 EVQLVESGGRLVQPGG 7 SRLRCKNAGSTSN	1 8 1	1 WFRAPGKE 5 REFVA	2 4 9	2 GIWSSGDA 3 FYRNSVKG	1 7	3 WGQG 5 TQVTV 1 SS
NC55TNF_BMP1G2	1 4 EVQLVESGGGLVQIFGG 8 SRLRSCAASATISS	1 8 2	1 WYRQAPGK 6 QREWVA	2 5 0	2 SITIGSRTNY 4 ADSVKG	1 8	3 WGQG 5 TQVTV 2 SS
NC55TNF_BMP2A2	1 4 EVQLVESGGGLVQAGG 9 SRLRSCAASGQTSS	1 8 3	1 WFRQAPGE 7 GREFVA	2 5 1	2 RISGSDGSTY 5 YSDRAKD	1 9	3 WGQG 5 TQVTV 3 SS
NC55TNF_BMP2C2	1 5 EVQLVESGGGLVQIFGG 0 SRLRSCAASGSTFS	1 8 4	1 WYRQAPGK 8 GLEWVS	2 5 2	2 GIDSGGGSP 2 MYVDSVKG	1 2	3 WGKGT 5 QVTVS 4 S

Tabla 1 (continuación):

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
NC55TNF _BMP2F2	5 EVQLVESGGGLVQAG 1 DSLRLSCEAERSSN	8 RYNMA	1 WFRQAPGK 9 EREFLA	2 RVDVSGGNT 3 LYGDSVKD	8 RFTVSRINGKNAMYLQMNLSL 7 KPEDIAIYYCAA	2 GGWGTTQYDY 1 DY	3 WGQG 5 TOVTV 5 SS
NC55TNF _NC10	5 EVQLVESGGGLVQPG 2 GSLRLSCVCSGGCT	8 FSAYSMT	2 WVRQAPGK 0 AEEWVS	5 FINS DGSSTT 4 YADSVNG	8 RFKISRDNNAKNTLYLOMINSL 8 GPEDTAMYYCQR	2 RGYALD	3 RGGGT 5 QVTVS 6 S
NC55TNF _NC11	5 EVQLVESGGGLVQAG 3 DSLTLSCASSGRGFY	8 KNAMG	2 WFRQPPGK 1 EREFVA	5 SIKWINGNNT 5 YYADSVRG	8 RFTISRGNNAKNTENTVLSLOM 9 NSLKPEADTADYYCAA	2 DSSHYSYVYSK 3 AYEYDY	3 WGQG 5 TOVTV 7 SS
NC55TNF _NC1	5 EVQLVESGGGLVQPG 4 GSLRLSCVFSGFAPS	8 ASSMA	2 WVRQAPGK 2 YEEWVS	5 FINS DGSSTT 6 YADSVQG	8 RFTISRDNNAKNTLYLOMINSL 0 KSEDAMYYCGR	4 RGYGRD	3 RSGGI 5 QVTVS 8 S
NC55TNF _NC2	5 EVQLVESGGGLVQAG 5 GSLRLS CAASGRIFS	9 SYAMG	2 WFRQAPGK 3 EREFVA	5 AISWSGITIN 7 YADSVKG	8 RFTISRDNNAKNTVHLOMINSL 1 KPEDTAVYHCAV	2 VQPYSGGDYY 5 TGVVEEYDY	3 WGQG 5 TOVTV 9 SS
NC55TNF _NC3	5 EVQLVESGGGLVQPG 6 GSLRLSCVSGFIFS	0 AT\$MT	2 WVRQAPGK 4 AEEWVS	5 FINS DGSSTT 8 YADSVKG	8 RFTISRDNNAKNTLYLOMDDLL 2 QSEDAMYYCGR	6 RGYGRD	3 RSRGI 6 QVTVS 0 S
NC55TNF _NC5	5 EVQLVESGGGLVQAG 7 GSLRLS CAASGGAFS	1 NYDVG	2 WFRQAPGE 5 GREIVA	5 RISGGSDST 9 YSSNRAKG	8 RFTISRDNNAKNTVYLOMINSL 3 KREDTAVYYCRA	2 ARYNGTWSSN 7 DY	3 WGQG 6 TOVTV 1 SS

Clon	FRI	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FRA
NC55TN F_NC6	5 8	9 2	2 6	6 0	9 4	2 8	6 2
NC55TN F_NC7	5 9	9 3	2 7	6 1	9 5	2 9	6 3
NC55TN F_NC8	6 0	9 4	2 8	6 2	9 6	3 0	6 4
NC55TN F_S2C2	6 1	9 5	2 9	6 3	9 7	3 1	6 5
NC55TN F_S1C6	6 2	9 6	3 0	6 4	9 8	3 2	6 6
NC55TN F_S3C2	6 3	9 7	3 1	6 5	9 9	3 3	6 7

Notas a la Tabla I:

- ID se refiere a la SEQ ID NO en el listado de secuencias adjunto

- Para CDR1: SEQ ID NO: 164 corresponde a la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 167 corresponde a las SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17 corresponde a las SEQ ID NO: 17, SEQ ID NOS: 165 y 166 corresponde a las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 170 corresponde a las SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 171 corresponde a las SEQ ID NO: 251, antt SEQ ID NOS: 168 y 169 corresponden a las SEQ ID NO: 21.

- Para CDR2: SEQ ID NOS: 232 y 233 corresponde a las SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 235 corresponde a las SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 240 corresponde a la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 234 corresponde a la SEQ ID NO: 25, las SEQ ID NOS: 236 y 237 corresponden a las SEQ ID NO 26, SEQ ID NO: 238 corresponde a las SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 239 corresponde a las SEQ ID NO: 28.

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

En consecuencia, en los Nanocuerpos de la invención, al menos uno de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige de modo adecuado del grupo que consiste en las secuencias consisten en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID No: 164, SEQ ID No:232 y SEQ: 300, respectivamente, listada en la Tabla I; o del grupo de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID No: 164, SEQ ID No:232 y SEQ: 300, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% "identidad de secuencia" (como se define en la presente) con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID No: 164, SEQ ID No:232 y SEQ: 300, respectivamente, listada en la Tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) con al menos una de las secuencias de SEQ ID No: 164, SEQ ID No:232 y SEQ: 300 respectivamente, listadas en la Tabla E. En este contexto, por "elegido adecuadamente" significa que, cuando sea aplicable, una secuencia de CDR1 se elige de las secuencias de CDR1 adecuadas (es decir como se define en la presente), una secuencia de CDR2 se elige de las secuencias de CDR2 adecuadas (es decir como se define en la presente) y una secuencia de CDR3 se elige de las secuencias de CDR3 adecuadas (es decir como se define en la presente), respectivamente.

Aun más preferentemente, en los Nanocuerpos de la invención, las secuencias de los tres CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID No: 164, SEQ ID No: 232 y SEQ ID NO; 300, respectivamente, listado en la Tabla I.

Asimismo, generalmente, se prefieren las combinaciones de CDR listadas de la Tabla I (es decir, los mencionados en la misma línea en la Tabla I).

Preferentemente, cuando una secuencia de CDR se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de CDR listadas en la Tabla 1; y/o cuando una secuencia de CDR se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo diferencias de aminoácidos) con una de las secuencias de CDR listadas en la Tabla 1:

i) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

ii) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con la secuencia de CDR listada en la Tabla I.

De acuerdo con una realización no limitante pero no preferido de la invención, las secuencias de CDR en los Nanocuerpos de la invención son como se definieron anteriormente y también son tal que el nanocuerpo de la invención se une a la TNF-alfa con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro (M) o menos, y preferentemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro (M) o menos y más preferentemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (M), y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos 10^7 M^{-1} , preferentemente al menos 10^8 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^9 M^{-1} , tal como al menos 10^{12} M^{-1} , y en particular con una K_D menos de 500 nM, preferentemente menos de 200, más preferentemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 nM. Los valores de K_D y K_A del nanocuerpo de la invención contra TNF-alfa se puede determinar de una manera conocida per se, por ejemplo usando el ensayo descrito en la presente.

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

En un aspecto, la invención proporciona Nanocuerpos contra la TNF-alfa que se desempeñan mejor que el Nanocuerpo 3E, el Nanocuerpo de mejor desempeño de acuerdo con WO 04/041862.

Más específicamente, algunos aspectos preferidos descritos y/o reivindicados en la presente

5 XXI) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones estructurales (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), que tiene una tasa K_{off} para Tyr de mejor que $2 \cdot 10^{-3}$ (1/s), preferentemente menor que $1 \cdot 10^{-3}$ (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

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

10 XXV) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descritos en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.

algunos aspectos particularmente preferidos son:

- Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) que es un Nanocuerpo de la clase GLEW.
- 15 - Un Nanocuerpo de con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) que contiene un residuo de arginina (R) en la posición
- Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) que es un Nanocuerpo humanizado.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.
- 20 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente 95%, más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácidos de (SEQ ID) NOs: 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (TNF30).
- Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende las secuencia de aminoácido SPSGFN.
- 25 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de EINTNGLITKYPDSVKG
- Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 30 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 35 - CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 40 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que:
- a) CDR1 es:
 - la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
 - 45 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos DYWMY; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- y en que:
- b) CDR2 es:
 - 5 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
 - 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácidos) con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;
 - y en que
 - c) CDR3 es:
 - la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - 15 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun con más preferencia al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - 20 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY;
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - 25 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que:
 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
 - CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - 30 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN,
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - 35 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que
 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácidos; y/o
 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos.
 - y algunos otros aspectos particularmente preferidos son:
 - 40 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), que es un Nanocuerpo de clase KERE.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), en que
 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido; y/o
 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos.

Un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), que es un Nanocuerpo humanizado.

y con aún algunos otros aspectos particularmente preferidos son:

XXVI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV).

5 XXVII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV).

XXVIII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV)

y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.

10 XXIX) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), y que es capaz de experimentar la unión intramolecular a al menos dos TNF sitios de unión al receptor en un Trímero de TNF.

XXX) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), unido por medio de un ligador adecuado.

15 XXXI) Una proteína o polipéptido, que comprende dos Nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), unido por medio de un ligador adecuado, y que está pegilado.

XXXII) Una proteína o polipéptido que comprende dos Nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV), y que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

20 XXXIII) Una proteína o polipéptido que comprende dos Nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) y que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.

25 XXXIV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) que además comprende al menos un Nanocuerpo

dirigido contra albúmina sérica humana y que es capaz de experimentar unión intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en los trímeros de TNF.

30 XXXV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) y que además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que cada uno de los dos Nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado al Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana,

35 XXXVI) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) y que además comprende un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que cada uno de los dos Nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) y que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.

40 XXXVII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana en que cada uno de los dos Nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, al Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es capaz de experimentar unión intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor en un trímero TNF.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XXVI) a XXXVII) en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.

45 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XXVI) a XXXVII), en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

50 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XXVI) a XXXVII), en que al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es uno seleccionado del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ, ID NO: 102) ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XXVI) a XXXVII), en que al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

5 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XXVI) a XXXVII), que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos humanizados de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

10 Cabe mencionar que cuando un Nanocuerpo se menciona anteriormente como "de acuerdo con cualquiera de XXI), XXIV) o XXV) anterior", está al menos de acuerdo con uno de XXI), XXIV) o XXV), puede estar de acuerdo con dos o más de XXI), XXIV) o XXV), y también pueden incluir alguno o más de los otros aspectos que se indican como que están "de acuerdo con alguno de XXI), XXIV) o XXV) anterior". De modo similar, cuando una proteína o polipéptido se menciona anteriormente como ser "de acuerdo con cualquiera de XXVI) a XXXVI) anterior", está al menos de acuerdo con uno de XXVI) a XXXVI), puede estar de acuerdo con dos o más de XXVI) a XXXVI), y también puede incluir alguno o más de los otros aspectos que se indican como que están "de acuerdo con cualquiera de XXVI) a XXXVI) anterior".

15 Se ha hallado que un clon particularmente útil como un anticuerpo anti-TNF es el clon PMP1C2 (TNF1). Como se puede observar a partir de los datos comparativos del ensayo de KYM en la Tabla 39, TNF1 tiene un valor de EC50 que es más de 4 veces mejor que el mejor Nanocuerpo monovalente descrito en WO 04/41862 (Nanocuerpo 3E), es decir 2,466 nM para PMP1C2 versus 12 nM para 3E (como se puede observar a partir de la Tabla 39, todos los Nanocuerpos TNF1 a TNF 9 de la invención dieron un valor mejor de EC50 en este ensayo que 3E). En este aspecto, también se debe indicar que el Nanocuerpo 3E de WO 04/41862 pertenece a la "clase KERE" (como se describe en la presente), y en consecuencia se puede humanizar en un grado menor que el Nanocuerpo PMP1C2 (que pertenece a la "clase GLEW"). Cuando el Nanocuerpo PMP1C2 se compara con el nanocuerpo 1A de WO 04/41862, un Nanocuerpo clase GLEW con el mayor grado de homología de secuencia con PMP1C2 (tanto en las CDR como las estructuras), el valor de E50 obtenido para PMP1C2 en el ensayo KYM es más de 50 veces mejor, es decir 2,466 nM para PMP1C2 en comparación con 100 nM para 1A.

25 Por consiguiente, los Nanocuerpos descritos y reivindicados en la presente comprenden uno o más, preferentemente dos y más preferentemente los tres CDR presentes en el clon PMP1C2 (o secuencias de CDR que derivan de estas o corresponden a estas) son particularmente preferidos en la invención. Asimismo, estos Nanocuerpos preferentemente pertenecen al "grupo 103 P,R,S" (como se define en la presente), y con máxima preferencia tienen un R en la posición 103, y preferentemente también tienen una secuencia GLEW o tipo GLEW en las posiciones 44-47. Asimismo, cuando dos estos nanocuerpos pertenecen al "grupo 103 P,R,S" (y en particular cuando tienen un R en la posición 103), una sustitución humanizante preferida pero no limitante es 108Q a 108L. Otras sustituciones humanizantes limitantes pero no preferidas en estos Nanocuerpos son una o más de los presentes en las variantes humanizadas de TNF1 que se describen en la presente, tal como TNF13, TNF14, TNF29 o TNF30, que serán inmediatamente evidentes a partir de una comparación entre la secuencia de TIF1 y estas secuencias humanizadas.

35 En consecuencia, en un nanocuerpo particularmente preferido de la invención, al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 se elige adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de "identidad de secuencia" (como se define en la presente) con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232., y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NC: 300, respectivamente,

45 Preferentemente, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, al menos dos de las secuencias de CDR1, CD2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente.

55 Con máxima preferencia, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, las tres secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del

grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente.

5 Aun más preferentemente, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1). Preferentemente, en esta realización, al menos uno o preferentemente las otras dos secuencias de CDR presentes se eligen adecuadamente de las secuencias de CDR que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente.

15 Aun más preferentemente, en estos Nanocuerpos preferidos de la invención, al menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1). Preferentemente, en esta realización, La restante secuencia de CDR presente se eligen adecuadamente del grupo de las secuencias de CDR que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95% aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia de aminoácido) con la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ U) NO: 300, respectivamente.

25 Los nanocuerpos particularmente preferidos de la invención comprenden la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir la secuencias de CDR presente en el clon TNF1).

30 Los Nanocuerpos con las anteriores secuencias de CDR preferentemente tienen secuencias estructurales que son como también se definen en la presente. Algunas combinaciones preferidas, pero no limitantes de las secuencias estructurales se pueden observar en la Tabla I anterior. Como será evidente para los expertos, usualmente se preferirá una combinación de las secuencias de FR1, FR2, FR3 y FR4 que se producen en el mismo clon (es decir, secuencias de FR1, FR2, FR3 y FR4 que se mencionan en la misma línea de la Tabla I) (si bien la invención en su sentido más amplio no se limita a esto, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias estructurales mencionadas en la Tabla I).

35 Más específicamente, algunos aspectos preferidos descritos y reivindicados en la presente son:

XXXVIII) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones estructurales (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en que:

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o

40 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;

y

45 b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos

EINTNGLITKYPDSVKG; o

50 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;

y

- c) CDR3 comprende:
- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII), en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII), en que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII), en que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII) de acuerdo con XXXVIII) en que:
 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYW"; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
 - CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con VIII), en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII) en que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, en que
 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido; y/o
 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con la anterior secuencia de aminoácido.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, que es un Nanocuerpo de clase GLEW.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aún más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nos 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (TNF30).
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, que es un Nanocuerpo humanizado.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, que tiene una tasa de K_{off} para el TNF de mejor que 2.10^{-3} (1/s), preferentemente mejor que 1.10^{-3} (1/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo;
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descritos en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVIII que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descritos en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- XXXIX) Un Nanocuerpo contra TNF-alfa descrito y reivindicado en la presente, que consiste en 4 regiones estructurales (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en que
- a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos SE}%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos DYWMY; o
- 5 una secuencia de aminoácidos solo tiene 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- y en que:
- b) CDR 2 es:
- la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;
- y en que
- 15 e) CDR3 es:
- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 20 - una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX) en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), en que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), en que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), en que:
- 25 '- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
 - CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN
 - Un Nanocuerpo acuerdo con XXXIX), en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 30 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), en que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), en que:
 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido; y/o
- 35 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que es un nanocuerpo de clase GLEW.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NOs 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14); 95 (TNF29) o 96 (TNF30).
- 40 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que es un Nanocuerpo humanizado.

- Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que tiene una tasa de Koff para TNF mejor e 2.10^{-3} (l/s), preferentemente mejor que 1.10^{-3} (l/s); o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- 5 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3) del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3) del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal Nanocuerpo.
- 10 - Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX) se elige del grupo que consiste en TNF 13 (SEQ ID NO: 76), TNF 14 (SEQ ID NO: 77), TNF 29 (SEQ ID NO: 95) y TNF 30 (SEQ ID NO: 96).
- Un Nanocuerpo de acuerdo con XXXIX), que es TNF 30 (SEQ ID NO: 96);
- algunos otros aspectos preferidos son:
- 15 XL) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVII) o XXXIX) o
- XLI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanocuerpo de acuerdo con XXXVII) o XXXIX),
- 20 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXXVII) o XXXIX). - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señales que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX), y que es capaz de experimentar unión intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de
- 25 TNF sobre un trímero TNF.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX), que se unen directamente entre sí o se ligan entre sí por medio de un ligador.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX), que se unen entre sí por medio de una secuencia de aminoácidos.
- 30 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXVXVIII) o XXXIX), que se unen entre sí por medio de una secuencia de aminoácidos (tal como, sin limitación, una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de serina y glicina) que comprende al menos 14 aminoácidos, más preferentemente al menos 17 aminoácidos, tal como aproximadamente 20-40 aminoácidos (tal como el ligador GS30).
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el
- 35 polipéptido TNF 7 (SEQ ID NO: 73), en que ambos Nanocuerpos TNF han sido humanizados.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 55 (SEQ ID NO: 419) o TNF 56 (SEQ ID NO: 420).
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que está pegilado.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero TNF, es capaz de
- 40 inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor; y/o que es tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de experimentar unión intramolecular a al menos dos sitios de unión del receptor TNF en un trímero de TNF, y tal proteína o polipéptido también comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
- 45 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX), y tal proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que los dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX) se unen entre sí por medio de al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y en que los dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX) se ligan directamente a al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, o se unen a al menos
- 50 un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana por medio de un ligador.

- 5 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX), y tal proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que los dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX) se unen entre sí por medio de al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y en que los dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX) se unen directamente a al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, o se unen a al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana por medio de un ligador, en que el ligador es una secuencia de aminoácidos (tal como, sin limitación, un ligador que comprende residuos de serina y glicina), y en particular una secuencia de aminoácidos que comprende entre 3 y 40 residuos de aminoácidos, tal como entre 5 y 15 residuos de aminoácidos (tal como el ligador GS9).
- 10 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXDUX), y tal proteína o polipéptido además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en que los dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX) se unen entre sí por medio de al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y en que los dos Nanocuerpos de acuerdo con XXXVIII) o XXXIX) se unen directamente a al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, o se unen a al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana por medio de un ligador, y que la proteína o polipéptido es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediado por tal entrecruzamiento del receptor; y/o que la proteína o polipéptido es tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de experimentar unión intramolecular a al menos dos sitios de unión del receptor TNF on a trímero TNF.
- 15 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un Nanocuerpo humanizado.
- 20 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), en que al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).
- 25 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige de un grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102) ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.
- 30 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos humanizados de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI) y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF24 (SEQ ID NO: 90), en que el nanocuerpo TNF 1 así como el nanocuerpo ALB 1 se ha humanizado.
- 35 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos TNF 30 y un Nanocuerpo ALB 8.
- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).
- 40 Cabe mencionar que cuando un Nanocuerpo se menciona anteriormente como "de acuerdo con XXXVIII" o "de acuerdo con XXXIX", está al menos de acuerdo con uno de XXXVIII) o XXXIX), y también puede incluir alguno o más de otros aspectos que se indican como que están "de acuerdo con XXXVIII" o "de acuerdo con XXXIX" anteriormente. De modo similar, cuando se mencionó anteriormente una proteína o polipéptido como que está "de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI)", está al menos de acuerdo con uno de XL) a XLI), puede estar de acuerdo con dos o más de VI) a XVIII), y también puede incluir alguno o más de los otros aspectos que se indican como "de acuerdo con cualquiera de XL) o XLI) anterior.
- 45 Para los Nanocuerpos basados en el Nanocuerpo TNF1 anterior (que incluyen pero sin limitación los Nanocuerpos humanizados), las secuencias estructurales generalmente se pueden describir en la presente, y preferentemente son las siguientes:
- a) FR1 comprende o es:
- 50 - la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 130; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 130; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 130;

y

b) FR2 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 198; o

- 5 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 198; o una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 198;

y

10 c) FR3 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 266; o

- 15 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 266; o una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 266.

y

d) FR4 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 334; o

- 20 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 334; o una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 334;

en que la diferencia de aminoácidos presentes en las secuencias estructurales son más preferentemente como se describe en la presente.

- 25 En otro aspecto, la invención se refiere a un Nanocuerpo con una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NOs. 52, 76, 77, 95 o 96.

- 30 Con máxima preferencia, los Nanocuerpos de la invención se eligen del grupo que consiste en la SEQ ID Nos 76, 77, 95 o Se prefieren particularmente las variantes humanizadas del clon PMP1C2 (TFN1; SEQ ID NO: 52). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales variantes humanizadas son los clones TNF13 (SEQ ID NO: 76), TNF14 (SEQ ID NO.:77), TNF29 (SEQ ID NO: 95) y TNF 30 (SEQ ID NO: 96). En consecuencia, en un aspecto preferido, la invención se refiere a un Nanocuerpo humanizado con una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 76, 77, 95 o 96.

Algunos aspectos preferidos de esta realización de la invención son:

- 35 LI) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células que usa células KYM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM.

LI) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células que usa células KYM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM.

LIII) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanocuerpo que es una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1 de acuerdo con cualquiera de LI) a LII).

- 40 LIV) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF I de acuerdo con cualquiera de LI) a LII) (opcionalmente unido por medio de un ligador),

- 45 LV) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF1 de acuerdo con cualquiera de LI) a LII) (opcionalmente unido por medio de un ligador), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.

LVI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos que son variantes

humanizadas del nanocuerpo TNF1 de acuerdo con cualquiera de LI) a LII) que es capaz de experimentar unión intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF sobre un trímero de TNF.

LVII) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF7 (SEQ ID NO: 73), en que ambos Nanocuerpos TNF1 se han humanizado.

5 LVIII) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF7 (SEQ ID NO: 73), en que ambos Nanocuerpos TNF1 se han humanizado, y que están pegilados.

LIX) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 1 de acuerdo con cualquiera de LI) a LII) y que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra la albúmina sérica humana.

10 LX) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 1 de acuerdo con cualquiera de LI) a LII), que están unidas (opcionalmente unidas por medio de un ligador) a un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de LIII) a LX), en que al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un Nanocuerpo humanizado.

15 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de LIII) a LX), en que al menos un Nanocuerpo dirigido contra la albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de LIII) a LX), en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige de un grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102) ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).

20 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de LIII) a LX), en que el al menos un Nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

- Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de LIII) a LX), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF24 (SEQ ID NO: 90), en que el nanocuerpo TNF 1 así como el nanocuerpo ALB TNF 1 se han humanizado.

25 - Una proteína o polipéptido de acuerdo con cualquiera de LIII) a LX), que comprende o consiste esencialmente en dos Nanocuerpos TNF 30 y un Nanocuerpo ALB 8.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanocuerpo contra TNF-alfa como se define en la presente, Tales polipéptidos también se denominan en la presente como "polipéptidos de la invención" y pueden ser como se describe adicionalmente más adelante en la presente y/o como se describe generalmente en el documento WO 04/041862 para los Nanocuerpos desvelados en la presente y por ejemplo, pueden ser polipéptidos multivalentes o polipéptidos multiespecíficos, nuevamente como se describen adicionalmente más adelante en la presente.

35 Preferentemente, un polipéptido de la invención es bivalente o trivalente (es decir, que comprende dos o tres Nanocuerpos de la invención, respectivamente, opcionalmente ligados por medio de uno o dos ligadores que se definen más adelante, respectivamente) o un polipéptido multiespecífico, que comprende uno o dos, y preferentemente dos, Nanocuerpos de la invención y al menos un Nanocuerpo dirigido contra una proteína sérica, y en particular contra una proteína sérica humana, tal como contra albúmina sérica humana.

40 En una realización preferida, pero no limitante, los Nanocuerpos de la invención presentes en los polipéptidos de la invención se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 52 a 60 y SEQ ID NOs 105-129 o de sus variantes humanizadas, y en particular de los Nanocuerpos "humanizados" de la SEQ ID NOs 76 a 86 y SEQ ID NOs: 95 a 99. Los Nanocuerpos contra albúmina sérica humana presentes en los polipéptidos de la invención son preferentemente como se definen a continuación, más preferentemente se eligen del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 61 a 67, SEQ ID) NOs: 87 a 89 y SEQ ID NOs: 100-104, y en particular de los Nanocuerpos "humanizados" contra albúmina sérica humana de la SEQ ID NOs 76 a 86 y SEQ ID NOs 100-104.

45 Con respecto a los Nanocuerpos que están presentes en los polipéptidos de la invención, será evidente para los expertos que los Nanocuerpos que se mencionan en la presente como "preferidos" (o como "más preferidos", "aun más preferidos", etc.) también son preferidos (o más preferidos, o aun más preferidos, etc.) para el uso en los polipéptidos descritos en la presente. En consecuencia, los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más Nanocuerpos "preferidos" de la invención se preferirán generalmente, y los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más Nanocuerpos "más preferidos" de la invención generalmente serán más preferidos, etc.

En consecuencia, en la invención, los polipéptidos que comprenden uno o más Nanocuerpos que consisten esencialmente en una de las variantes preferidas del clon PMP1C2 (TNF 1; SEQ ID NO: 52), en que dichas variantes preferidas definidas en la presente, son particularmente preferidas. Aun se prefieren más los polipéptidos que

comprenden uno o más Nanocuerpos que consisten esencialmente en una de las variantes humanizadas del clon PMP1C2 (TNF1; SEQ ID NO: 52), en que dichas variantes humanizadas son como se definen en la presente (los ejemplos son sin limitación, TNF13, TNF14, TNF29 y TNF30). TNF30 es un "bloque de construcción" humanizado particularmente preferido para usar en los polipéptidos de la invención.

5 Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales proteínas y polipéptidos son PMP1C2 mismo, las variantes humanizadas TNFL3, TNF 14, TNF29 y TNF30; los constructos de la SEQ ID NO: 70 (TNF4), SEQ ID NO: 73 (TNF7), SEQ ID NO: 90 (TNF24), SEQ ID NO: 93 (TNF27); y los constructos de la SEQ ID NO: 417 (TNF60), SEQ ID NO: 419 (TNF55) y SEQ ID NO: 420 (TNF56), en que estos últimos tres constructos contienen la variante humanizada TNF 30 como un bloque de construcción.

10 Como se menciona en la presente, los Nanocuerpos y constructos descritos en la presente pueden estar pegilados, o contener uno o más residuos de aminoácidos (adicionales) que permiten la pegilación y/o facilitan la pegilación. Dos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales polipéptidos son TNF55 y TNF56, los cuales contienen un residuo de cisteína adicional para la unión sencilla de un grupo PEG.

15 Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de los polipéptidos de la invención son el polipéptido bivalente de la invención y el polipéptido multiespecífico de la invención de la SEQ ID NOs: 90 y 93 y las SEQ ID NOs 417 a 420.

20 Como se puede observar a partir de los siguientes datos representados, y en particular de los datos dados en el Ejemplo comparativo, los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención tienen propiedades mejoradas. En particular, las proteínas y polipéptidos de la invención pueden tener mejor afinidad por TNF-alfa humana (expresada como el valor de EC50 en el ensayo KYM que se describe en la presente), en comparación con ellos productos biológicos anti-TNF disponibles en el comercio EnbrelTM, HumiraTM y RemicadeTM. Asimismo, los Nanocuerpos descritos en la presente puede tener una mejor afinidad para TNF-alfa en comparación con el mejor desempeño del Nanocuerpo descrito en la Solicitud internacional WO 04/041862. En consecuencia, se puede esperar que los polipéptidos de la invención que comprende al menos uno de los Nanocuerpos de la invención también tendrá propiedades mejoradas en comparación con los polipéptidos que comprenden solo los Nanocuerpos contra TNF-alfa descritos en el documento WO 04/041862.

25 Más en particular, un polipéptido como se describe en la presente que comprende dos o más (y preferentemente dos) Nanocuerpos en la presente (y opcionalmente por ejemplo un Nanocuerpo contra albúmina sérica humana), tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de células KIM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 de Humira® en Remicade®, y preferentemente también mejor que Enbrel® en el mismo ensayo.

30 Por ejemplo, tal proteína o polipéptido preferentemente tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de células KIM descritas en el Ejemplo 1, de acuerdo con 3), del WO 04/041862 que es mejor que 0,2 nM, preferentemente mejor que 0,1 nM, tal como mejor que 0,7 nM y en particular mejor que 0,4 nM.

35 Los solicitantes también han demostrado que los Nanocuerpos contra TNF-alfa de ratón y los polipéptidos que comprenden Nanocuerpos contra TNF-alfa de ratón muestran una actividad biológica beneficiosa en los siguientes modelos de enfermedad (datos no mostrados):

- El modelo de dextran sulfato de sodio ("DSS") de colitis, que emplea ratones regulares así como ratones deficientes en IL-10, descrito por Okayasu et al (Gastroenterol 1990, 30 98(3):694)

- El modelo de artritis inducida por colágeno ("CIA") ("CIA"), descrito por Courtenay et al. (Nature 1980, 283(5748): 666), por medio de ratones regulares así como ratones deficientes en IL-10;

40 - El modelo del ratón deficiente en IL-10 de IBD, por ejemplo descrito en Rennick et al (Clin Immunol Immunopathol 1995, 76(3 Pt 2): S 174)

- El modelo Kollias, por ejemplo como se describe en Keffer et al. (EMBO J 1991, 10(13): 4025)

- El modelo de ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico ("TNBS") de, que se describe en Elson et al. (J Immunol 1996, 157(5): 2174)

45 - El modelo CIA de RA, descrito por Koppeters et al (manuscrito en preparación);

- El modelo de fibroblasto derivado sinovial (que se describe más adelante); y

- El modelo de bolsa de aire murino.

50 Preferentemente, los nanocuerpos descritos en la presente son mejores que el Nanocuerpo 1A del documento WO 04/041862 en al menos uno de estos modelos, y preferentemente en todos estos modelos y con más preferencia son mejores que el Nanocuerpo 3E del documento WO 04/041862 en al menos uno de estos modelos, y preferentemente en todos estos modelos. Asimismo, los polipéptidos descritos en la presente son preferentemente equivalentes a o mejores que Humira® o Remicade® en al menos de estos modelos, y preferentemente en todos estos modelos; y más preferentemente también equivalente a o mejor que Enbrel® en al menos uno de estos modelos, y preferentemente en

todos estos modelos.

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

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un Nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención. Tal ácido nucleico también se referirá a continuación como un "ácido nucleico de la invención" y por ejemplo puede estar en las formas de un constructo genético, que se define más adelante.

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

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

La invención también se refiere a procedimientos para preparar o generar Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones que se describe en la presente, estos procedimientos también se describen a continuación. Asimismo, generalmente, los Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en la presente también se pueden preparar y usar de una manera análoga a la manera descrita en el documento WO 04/041862.

La invención también se refiere a aplicaciones y usos de los anteriores Nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritas en la presente, tales aplicaciones y uso incluyen, pero sin limitación, la aplicaciones y usos descritos más adelante en la presente y/o los usos y aplicaciones adicionales para Nanocuerpos contra TNF-alfa y/o para los polipéptidos que contienen los mismos en el documento WO 04/041862.

Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención serán evidentes a partir de la descripción adicional más adelante en la presente.

Descripción detallada de la invención

Los anteriores y otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la descripción adicional más adelante en la presente, en que:

a) A menos que se indique o defina lo contrario, todos los términos usados tienen su significado usual en la técnica, que será evidente para los expertos. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándares, tales como Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd.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, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principios of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10th Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); y Janeway et al., "Irrnimmunobiolol y" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), así como los antecedentes generales de la técnica mencionados en la presente;

b) A menos que se indique lo contrario, el término "secuencia de inmunoglobulina" – sea que se use en la presente para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un convencional anticuerpo de 4 cadenas – se usa como un término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, sus cadenas individuales, así como las partes, dominios o fragmentos de estos (que incluyen pero sin limitación dominios de unión al antígeno o fragmentos tales como V_{HH} o dominios VH/VL, respectivamente). Además, el término "secuencia" como se usa en la presente (por ejemplo en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia del anticuerpo", "secuencia del dominio variable", "secuencia V_{HH} " o "secuencia de la proteína"), se deben entender generalmente que incluyen tanto las secuencias de aminoácidos relevantes así como secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican los mismos, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada;

c) A menos que se indique lo contrario, todos los procedimientos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida per se, como será evidente para los expertos. Se hace referencia, por ejemplo, nuevamente a los manuales estándares, a la técnica de antecedentes general mencionados anteriormente y a las adicionales referencias citadas en el presente;

d) Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con los códigos de aminoácidos tres letras o una letra estándares, mencionados en la Tabla 4;

Tabla 1: Códigos aminoácidos de una letra y tres letras

No polar, no cargado (a pH 6,0-7,0)	Alanina	Ala	A
	Valina	Val	V
	Leucina	Leu	L
	Isoleucina	Ile	I
	fenilalanina	Phe	F
	Metionina ⁽¹⁾	Met	M
	Triptofano	Trp	W
	Prolina	Pro	P
Polar, no cargado (a pH 6,0-7,0)	Glicina ⁽²⁾	Gly	G
	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Cisteína	Cys	C
	Asparagina	Asn	N
	Glutamina	Gln	Q
Polar, Cargado (a pH 6,0-7,0)	Tirosina	Tyr	Y
	Lisina	Lys	K
	Arginina	Arg	R
	Histidina	His	H
	Aspartato	Asp	D
Notas.	Glutamato	Glu	E
	(1)	Algunas veces considerado como un aminoácido polar no cargado.	
(2)	Algunas veces considerado como un aminoácido no polar no cargado		
(3) Como será evidente para los expertos, el hecho que un residuo de aminoácido se mencione e esta tabla como cargado o no cargado a pH 6,0 a 7,0 no se refleja de ninguna manera en la carga, dicho residuo de aminoácido pueden tener un pH menor que 6,0 y/o a un pH más alto que 7,0, los residuos de aminoácidos mencionados en esta tabla pueden estar cargados y/o no cargados a tal pH más alto o más bajo, como será evidente para los expertos.			
(4) Como es conocido en la técnica, la carga de un residuo de His es muy dependiente de incluso pequeños cambios de pH, pero un residuo de His generalmente se puede considerar esencialmente no cargado a un pH de aproximadamente 6,5.			

5 e) Para los fines de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primer secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos se puede calcular por la división de [el número entero de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos en los nucleótidos a las correspondientes posiciones en la segunda secuencia de nucleótidos] por [el número entero de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos] y multiplicar por [100%], en que cada supresión, inserción, sustitución o adición de un

nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos en comparación con la primera secuencia de nucleótidos – se considera como una diferencia en un nucleótido único (posición).

5 Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos se puede calcular por medio de un algoritmo de computadora conocido para el alineamiento de secuencias tales como NCBI Blast v2.0, por medio de ajustes estándares.

Algunas otras técnicas, algoritmos de computadora y ajustes para determinar el grado de identidad de secuencia, por ejemplo se describen en WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00155318, WO 00178972, WO 98149185 y GB 2 357 768-A.

10 Usualmente, para el fin de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre las dos secuencias de nucleótidos está de acuerdo con el procedimiento de cálculo descrito en la presente anteriormente, la secuencia de nucleótidos con el mayor número de nucleótidos se tomará como la "primera" secuencia de nucleótidos, y la otra secuencia de nucleótidos se tomará como la "segunda" secuencia de nucleótidos;

15 f) Para los fines de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos se puede calcular por la división del [número de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las correspondientes posiciones en la segunda secuencia de aminoácidos] por [el número total de residuos de aminoácidos de la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicar por y [100%], en que cada supresión, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos – en comparación con la primera secuencia de aminoácidos – se considera como una diferencia en un residuo de aminoácido único (posición), es decir como una "diferencia de aminoácido" que se define más adelante.

20 Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede calcular por medio de un algoritmo de computadora, tal como los mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad de secuencia para las secuencias de nucleótidos, nuevamente por medio de ajustes estándares.

25 Usualmente, para el fin de determinar el porcentaje de la "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el procedimiento del cálculo descrito en la presente anteriormente, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos de aminoácidos se tomará como la "primera" secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará la "segunda" secuencia de aminoácidos.

30 Asimismo, para determinar el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, los expertos pueden tomar en cuenta las llamadas sustituciones de aminoácido "conservadoras", que en general se pueden describir como sustituciones de aminoácido en que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido de similar estructura química y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia en la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones conservadoras de aminoácidos son bien conocidas en la técnica, por ejemplo de los documentos WO 04/037999, GB-A-2 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y tipos y/o combinaciones (preferidas) de tales sustituciones se pueden seleccionar sobre la base de las enseñanzas pertinentes del documento WO 04/037999 así como el documento WO 98/49185 y de las referencias adicionales allí mencionadas.

35 Estas sustituciones conservadoras preferentemente son sustituciones en que un aminoácido de los siguientes grupos (a) - (e) se sustituye con otro residuo de aminoácido del mismo grupo: (a) residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos con carga negativa, polares y sus amidas (no cargados): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos con carga positiva, polares: His, Arg y Lys; (d) residuos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

40 Las sustituciones conservadoras particularmente preferidas son las siguientes: Ala en Gly o en Sec; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; His en Asn o en Gln; Ile en Leu o en Val; Leu en Ile o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en Ile; Phe en Met, en Leu o en Tyr, Ser en Thr, Thr en Ser; Trp En Tyr, Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

45 Cualquiera de las sustituciones de aminoácido aplicadas a los polipéptidos descritos en la presente también se pueden basar en el análisis de las frecuencia de las variaciones de aminoácido entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrolladas por Schulz et al, Principios of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, sobre el análisis de potenciales formadores de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 50 47: 45-149, 1978, y sobre el análisis de patrones de hidrofobicidad en las proteínas desarrollado por Eisenberg et al., Proc. Nad. Acad Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 1981, y Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986, todos incorporados en la presente en su totalidad por referencia. La información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de los Nanocuerpos dados en la descripción en la presente y de la técnica previa generalmente mencionados anteriormente. Asimismo, para este fin, la estructura cristalina de un dominio V_{HH} de una llama por ejemplo se proporciona en Desmyter et al., Nature Structural Biology, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al, Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; y Decanniere et al., Structure, Vol. 7, 4, 361 (1999). Información adicional acerca de algunos de los residuos de aminoácido que en los dominios VH convencionales forman la interfaz VH/VL y potenciales sustituciones camelizantes en estas posiciones se pueden hallar en la técnica

previa sobre Nanocuerpos mencionada en la presente;

g) se dice que las secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos son "exactamente iguales" si ellas tienen 100% de identidad de secuencia (como se define en la presente) respecto de su longitud completa;

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

10 i) una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos se considera que está "(en forma) esencialmente aislada" - por ejemplo, en comparación con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo del cual se ha obtenido - cuando se ha separado de al menos un componente diferente con el que está usualmente asociado en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente menor. En particular, una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos se considera "esencialmente aislada" cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos que está "en forma esencialmente aislada" es preferentemente esencialmente homogénea, que se determina por medio de una técnica adecuada, tal como una técnica de cromatografía adecuada, tal como electroforesis de gel de poliacrilamida;

20 j) El término "dominio" como se usa en la presente se refiere en general a una región globular de una cadena del anticuerpo, y en particular a una región globular de un anticuerpo de cadena pesada, o a un polipéptido que consiste esencialmente en tal región globular. Usualmente, tal dominio comprenderá bucles de péptidos (por ejemplo 3 o 4 bucles de péptidos) estabilizados, por ejemplo, como una hoja o enlaces disulfuro.

k) El término "determinante antigénico" se refiere a el epítopo del antígeno reconocido por la molécula de unión al antígeno (tal como un Nanocuerpo o un polipéptido de la invención) y más en particular por el sitio de unión al antígeno de dicha molécula. Los términos "determinante antigénico" y "epítopo" también se pueden usar de modo indistinto.

25 i) Una secuencia de aminoácidos (tal como un Nanocuerpo, un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o generalmente una proteína o polipéptido de unión al antígeno o fragmento de este) que se puede unir a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico, epítopo antígeno o proteína específico (o por al menos una parte, fragmento o epítopo de este) se dice que es "contra" o "dirigido contra" dicho determinante antigénico, epítopo, antígeno o proteína.

30 m) El término "especificidad" se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos a los que una molécula de unión al antígeno o molécula de proteína de unión al antígeno particular (tal como un Nanocuerpo o un polipéptido de la invención) se puede unir. La especificidad de una proteína de unión al antígeno se puede determinar sobre la base de la afinidad y/o avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión al antígeno (K_D), es una medida para la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión al antígeno en la proteína de unión al antígeno: a menor valor de la K_D , mayor fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión al antígeno (alternativamente, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$). Como será evidente para los expertos (por ejemplo sobre la base de la posterior descripción en la presente), la afinidad se puede determinar de una manera conocida per se, de acuerdo con el antígeno específico de interés. Avidéz es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión al antígeno (tal como un Nanocuerpo o polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente. La avidéz se relaciona con la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión al antígeno sobre la molécula de unión al antígeno y el número de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión al antígeno. Normalmente, las proteínas de unión al antígeno (tales como los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención) se unirán con una constante de disociación 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro (M) o menos, y preferentemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro (M) o menos y más preferentemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro, y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos 10^7 M^{-1} , preferentemente al menos 10^8 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^9 M^{-1} , tal como al menos 10^{12} M^{-1} . Cualquier valor de K_D mayor de 10^{-1} generalmente se considera que indica unión no específica. Preferentemente, un Nanocuerpo o polipéptido de la invención se unirá al antígeno deseado con una K_D es menor de 500 nM, preferentemente menos de 200 nM, más preferentemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 nM. La unión específica de una proteína de unión al antígeno a un antígeno o determinante antigénico se puede determinar de alguna manera adecuada conocida per se, que incluye, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tal como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición sándwich, y las diferentes variantes de estas conocidas per se en la técnica.

55 n) como también se describe más adelante en la presente, la secuencia de aminoácidos y estructura de un Nanocuerpo se puede considerar - sin embargo se limita a esto - que está compuesta de cuatro regiones estructurales o "FR", que se mencionan en la técnica y más adelante en la presente como "Región estructural 1" o "FR1"; como "Región estructural 2" o "FR2"; como "Región estructural 3" o "FR3"; y como "Región estructural 4" o "FR4", respectivamente; tales regiones estructurales se interrumpen con tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "Región determinante de complementariedad 1" "CDR1"; como "Región determinante de

complementariedad 2" o "CDR2"; y como "Región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente;

o) como también se describe más adelante en la presente, el número total de residuos de aminoácidos en un Nanocuerpo puede estar en la región de 110-120, preferentemente 112-115, y con máxima preferencia 113. Sin embargo, se debe indicar que las partes, fragmentos o análogos (que se describe adicionalmente más adelante en la presente) de un Nanocuerpo no están limitadas particularmente en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos o análogos cumplan los requerimientos indicados más adelante en la presente y también son preferentemente adecuados para los fines descritos en la presente;

p) los residuos de aminoácidos de un Nanocuerpo se numeran de acuerdo con la numeración general para los dominios VH dados por Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91), que se aplica a los dominios V_{HH} de los camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, mencionado anteriormente (ver por ejemplo Figura 2 de dicha referencia). De acuerdo con esta numeración, FR1 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos de las posiciones 1-30, CDR1 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos de las posiciones 31-36, FR2 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos de las posiciones 50-65, FR3 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos de las posiciones 66-94, CDR3 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos de las posiciones 95-102, y FR4 de un Nanocuerpo comprende los residuos de aminoácidos de las posiciones 103-113. (En este aspecto, cabe mencionar que – como bien se conoce en la técnica para los dominios VH y para los dominios V_{HH} - el número total de residuos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácidos indicados por la numeración de Kabat (es decir, una o más de las posiciones de acuerdo con la numeración de Kabat puede no estar ocupada en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración de acuerdo con Kabat puede o no puede corresponder a la numeración real de los residuos de aminoácidos en la secuencia real. Generalmente, sin embargo, se puede decir que, de acuerdo con la numeración de Kabat e independientemente del número de residuos de los aminoácidos en las CDR, la posición 1 de acuerdo con la numeración de Kabat corresponde a la del comienzo de FR1 y viceversa, la posición 36 de acuerdo con la numeración de Kabat corresponde a la de comienzo de la FR2 y viceversa, posición 66 de acuerdo con la numeración de Kabat corresponde a la de comienzo de la FR3 y viceversa, y posición 103 de acuerdo con la numeración de Kabat corresponde a la de comienzo de la FR4 y viceversa.

Los procedimientos alternativos para la numeración de los residuos de aminoácidos de los dominios VH, que también se pueden aplicar de una manera análoga a los dominios V_{HH} de los camélidos y a Nanocuerpos, son el procedimiento descrito por Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989)), la llamada "definición AbM" y la llamada "definición contacto". Sin embargo, en la presente descripción, reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración de acuerdo con Rabat aplicada a los dominios V_{HH} por Riechmann y Muyldermans, a menos que se indique lo contrario; y

q) las Figuras, Listado de Secuencias y la Parte Experimental/Ejemplos se dan solo para ilustrar adicionalmente la invención y no se deben interpretar o analizar como limitación del alcance de la invención y/o de las reivindicaciones anexas de ningún modo, a menos que se indique explícitamente de otro modo en la presente.

Para una descripción general de los anticuerpos de cadena pesada y sus dominios variables, se hace referencia entre otras a las siguientes referencias, que se mencionan en la los antecedentes de la técnica general: WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/140968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/140310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics N V y solicitante; WO 01/90190 por el National Research Council of Canada; WO 03/025020 (= EP 1 433 793) by the Institute of Antibodies; así como WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 por solicitante y otras solicitudes de patentes publicadas por el solicitante; Flamers-Castennan et al, Nature 1993 June 3; 363 (6428): 446-8; Davies y Riechmann, FEBS Lett. 1994 Feb 21; 339(3): 285-90; Muyldermans et al, Protein Eng. 1994 Sep; 7(9): 1129-3; Davies y Riechmann, Biotechnology (NY) 1995 May; 13(5): 475-9; Gharoudi et al., 9th Forum of Applied Biotechnology, Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 1995; 60/4a part I: 2097-2100; Davies y Riechmann, Protein Eng. 1996 Jun; 9(6): 531-7; Desmyter et al, Nat Struct Biol. 1996 Sep; 3(9): 803-1 1; Sheriff et al., Nat Strata Biol. 1996 Sep; 3(9): 733-6; Spinelli et al, Nat Struct Biol. 1996 Sep; 3(9): 752-7; Arbabi Ghahroudi et al., FEBS Lett. 1997 Sep 15; 414(3): 521-6; Vu et al, Mol Immunol. 1997 Nov-Dec; 34(16-17): 1121-31; Atarhouch et al, Journal of Camel Practice and Research 1997; 4: 177-182; Nguyen et al, J. Mol. Biol. 1998 Jan 23; 275(3): 413-8; Lauwereys et al, EMBO J. 1998 Jul 1; 17(13): 3512-20; Frenken et al, Res Immunol. 1998 Jul-Aug;149(6):589-99; Transue et al, Proteins 1998 Sep 1; 32(4): 515-22; Muyldermans y Lauwereys, J. Mot. Recognit. 1999 Mar-Apr; 12 (2): 13140; van der Linden et al., Biochim. Biophys. Acta 1999 Apr 12; 1431(1): 37-46.; Decanniere et al., Structure Fold. Des. 1999 Apr 15; 7(4): 361-70; Nguyen et al., Mol. Immunol. 1999 Jun; 36(8): 515-24; Woolven et al., Immunogenetics 1999 Oct; 50 (1-2): 98-101; Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods 1999 Dec 10; 231 (1-2): 25-38; Spinelli et al., Biochemistry 2000 Feb 15; 39(6): 1217-22; Frenken et al., J. Biotechnol. 2000 Feb 28; 78(t): 1.1-2.1; Nguyen et al, EMBO J. 2000 Mar 1; 19(5): 921-30; van der Linden et al, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-95; Decanniere et al, J. Mol. Biol. 2000 Jun 30; 300 (1): 83-91; van der Linden et al, J. Biotechnol 2000 Jul 14; 80(3): 261-70; Harmsen et al, Mol. Immunol. 2000 Aug; 37(10): 579-90; Perez et al, Biochemistry 2001 Jan 9; 40(1): 74-83; Conrath et al., J. Biol. Chem. 2001 Mar 9; 276 (10): 7346-50; Muyldermans et al., Trends Biochem Sci. 2001 Apr;26(4):230-5; Muyldermans S., J. Biotechnol. 2001 Jun; 74 (4): 277-302; Desmyter et al., J. Biol. Chem. 2001 Jul 13 ;276 (28): 26285-

- 90; Spinelli et al., J. Mol. Biol. 2001 Aug 3; 311 (1): 123-9; Conrath et al., Antimicrob Agents Chemother. 2001 Oct; 45 (10): 2807-12; Decanniere et al, J. Mot. Biol. 2001 Oct 26; 313(3): 473-8; Nguyen et al, Adv Immttnol. 2001; 79: 261-96; Muruganandam et al, FASEB J. 2002 Feb; 16 (2): 240-2; Ewert et al., Biochemistry 2002-
 5 Mar 19; 41 (I 1): 3628-36; Dumoulin et al., Protein Sci. 2002 Mar; 11 (3): 500-15; Cortez-Retamozo et al., Int. J. Cancer. 2002 Mar 20; 98 (3): 456-62; Su et al, Mol. Biol. Eliot. 2002 Mar; 19 (3): 205-15; van der Vaart JM., Methods Mol Biol. 2002; 178: 359-66; Vranken et al, Biochemistry 2002 Jul 9; 41 (27): 8570-9; Nguyen et al, Immunogenetics 2002 Apr; 54 (1): 39-47; Renisio et al, Proteínas 2002 Jun 1; 47 (4): 546-55; Desmyter et al., J. Biol. Chem. 2002 Jun 28; 277 (26): 23645-50; Ledebouer et al, J. Dairy Sci. 2002 Jun; 85 (6): 1376-82; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2002 Aug 16; 277 (33): 29897-907; Ferrat et al., Biochem. 3. 2002 Sep 1; 366 (Pt 2): 415-22; Thomassen et al, Enzyme and Microbial Technol. 10 2002; 30: 273-8; Harmsen et al., Appl Microbial. Biotechnol. 2002 Dec; 60 (4): 449-54; Jobling et al, Nat Biotechnol. 2003 Jan; 21 (1): 77-80; Conrath et al., Dev. Comp. Immunol. 2003 Feb; 27 (2): 87-103; Pleschberger et al, Bioconjug. Chem. 2003 Mar-Apr, 14 (2): 440-8; Lah et al, J. Biol. Chem. 2003 Apr 18; 278 (16): 14101-11; Nguyen et al., Immunology. 2003 May; 109 (1): 93-101; Joosten et al., Microb. Cell Fact. 2003 Jan 30; 2 (1): 1; Li et al, Proteinas 2003 Jul 1; 52 (1): 47-50; Loris et al., Biol Chem. 2003 Jul 25; 278 (30): 28252-7; van Koningsbruggen et al., Immunol. Methods. 2003 Aug; 15 279 (1-2): 149-61; Dumoulin et al, Nature. 2003 Aug 14; 424 (6950): 783-8; Bond et al, J. Mol. Biol. 2003 Sep 19; 332 (3): 643-55; Yau et al, J. Immunol. Methods. 2003 Oct 1; 281 (1-2): 161-75; Dekker et al., J. Virol. 2003 Nov; 77 (22): 12132-9; Meddeb-Mouelhi et al., Toxicon. 2003 Dec; 42 (7): 785-91; Verheesen et al., Biochim. Biophys. Acta 2003 Dec 5; 1624 (1-3): 21-8; Zhang et al., J Mol Biol. 2004 Jan 2; 335 (1): 49-56; Stijlemans et al., J, Biol Chem. 2004 Jan 9; 279 (2): 1256-61; Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 2004 Apr 15; 64 (8): 2853-7; Spinelli et al., FEBS Lett. 2004 Apr 23; 20 564 (1-2): 35-40; Pleschberger et al., Bioconjug. Chem. 2004 May-Jun; 15 (3): 664-71; Nicaise et al, Protein S'ei. 2004 Jul; 13 (7): 1882-91; Omidfar et al., Tumour Biol. 2004 Jul-Aug; (4): 179-87; Omidfar et al, Tumour Biol. 2004 Sep-Dec; 25(5-6): 296-305; Szynol et al, Antimicrob Agents Chemother. 2004 Sep;48(9):3390-5; Saerens et al., J. Biol. Chem. 2004 Dec 10; 279 (50): 51965-72; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2004 Dec 17; 279 (51): 53593-601; Dolk et al., Appl. Environ. Microbiol. 2005 Jan; 71(1): 442-50; Joosten et al., Appl Microbiol Biotechnol, 2005 Jan; 66(4): 384-92; Dumoulin 25 at alt, J. Mol. Biol. 2005 Feb 25; 346 (3): 773-88; Yau at al, J Immunol Methods 2005 Feb; 297 (1-2): 213-24; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2005 Apr 8; 280 (14): 14114-21; Huang et al, Eur. J. Hum. Genet. 2005 Apr 13; Dolk et al., Proteins. 2005 May 15; 59 (3): 555-64; Bond et al., J. Mol. Biol. 2005 May 6;348(3):699-709; Zarebski et al., J. Mol. Biol. 2005 Apr 21; (E-publicación antes de impresión].

30 De acuerdo con la terminología usada en las referencias anteriores, los dominios variables presentes en los anticuerpos de cadena pesada naturales también se denominarán como "Dominios V_{HH} ", a fin de distinguirlos de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominará más adelante en la presente como "dominios VH") y los dominios variables de cadena liviana que están presentes en anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominará más adelante en la presente como "dominios VL").

35 Como se mencionó en la técnica previa referida anteriormente, los dominios V_{HH} tienen numerosas características estructurales y propiedades funcionales únicas que hacen que los dominios V_{HH} aislados (así como Nanocuerpos basados en estos, que comparten estas características estructurales y propiedades funcionales con los dominios V_{HH} naturales) y las proteínas que contienen los mismos sean muy ventajosas para usar como dominios de unión o proteínas funcionales. En particular, y sin limitarse a esto, los dominios V_{HH} (que se han "diseñado" por la naturaleza 40 para unirse funcionalmente a un antígeno sin la presencia de, y sin ninguna interacción con, un dominio variable de cadena liviana) los Nanocuerpos pueden actuar como una unidad estructural, dominio o proteína de unión al antígeno, funcional, relativamente pequeño e individual. Esto distingue a los dominios V_{HH} de los dominios VH y VL de los anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, que generalmente no son adecuados de por sí para la aplicación práctica como proteínas o dominios de unión al antígeno individual, sino que necesitan combinarse de alguna forma u otra para proporcionar una unidad de unión al antígeno funcional (como por ejemplo, en los fragmentos de anticuerpo 45 convencionales tales como fragmentos Fab; en los fragmentos ScFv, que consisten en un dominio VH unido covalentemente a un dominio VL).

50 Debido a estas propiedades únicas, el uso de los dominios V_{HH} y los Nanocuerpos como proteínas de unión al antígeno únicas o como dominios de unión al antígeno (es decir, como parte de una proteína o polipéptido más grande) ofrece numerosas ventajas significativas respecto del uso de dominios VH y VL convencionales, scFv o fragmentos de anticuerpo convencionales (tales como fragmentos Fab- o F(ab')₂):

- solo se requiere un dominio único para unirse a un antígeno con alta afinidad y con alta selectividad, de modo que no existe la necesidad de tener dos dominios separados presentes, ni de asegurar que estos dos dominios estén presentes en la conformación y configuración espacial estrecha (es decir, a través del uso de ligadores especialmente diseñados, como con scFv);
- 55 - los dominios V_{HH} y Nanocuerpos se pueden expresar a partir de un gen único y no requieren plegado o modificaciones pos-traducción;
- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos se pueden manipular genéticamente en forma sencilla en formatos multivalentes y multiespecíficos (como se describe adicionalmente en la presente);
- los dominios dominio V_{HHS} y Nanocuerpos son altamente solubles y no tienen una tendencia a agregarse (como con

los dominios de unión al antígeno derivado de ratón descrito por Ward et al, Nature, Vol. 341, 1989, p. 544);

- los dominios V_{HH} y Nanocuerpos son muy estables para calentar, pH, proteasas y otros agentes desnaturalizantes o condiciones (ver por ejemplo Ewert et al, supra);

5 - los dominios V_{HH} y Nanocuerpos son sencillos y relativamente económicos para preparar, incluso en una escala requerida para la producción. Por ejemplo, los dominios V_{HH} , Nanocuerpos y proteínas/polipéptidos que contiene los mismos se pueden producir usando fermentación microbiana (por ejemplo que también se describe a continuación) y no requieren el uso de sistemas de expresión mamíferos, con por ejemplo fragmentos de anticuerpo convencionales;

10 - los dominios V_{HH} y Nanocuerpos son relativamente pequeños (aproximadamente 15 kD, o 10 veces menor que una IgG convencional) en comparación los anticuerpos de 4 cadenas convencionales y sus fragmentos de unión al antígeno, y en consecuencia muestran penetración mayor en tejidos (que incluyen pero sin limitación, tumores sólidos y otros tejidos densos) que tales anticuerpos de 4 cadenas convencionales y sus fragmentos de unión al antígeno;

15 - los dominios V_{HH} y Nanocuerpos pueden mostrar las llamadas propiedades de unión a la cavidad (entre otras debido a su bucle de CD3 extendido, en comparación con los dominios VH convencionales) y en consecuencia también pueden acceder a blancos y epitopes no accesibles para los anticuerpos de 4 cadenas convencionales y sus fragmentos de unión al antígeno. Por ejemplo, se ha demostrado que los dominios V_{HH} y Nanocuerpos pueden inhibir las enzimas (ver por ejemplo WO 97/49805; Transue et al., (1998), supra; Lauwereys et al., (1998), supra.

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

20 Como también se mencionó anteriormente y se describen adicionalmente a continuación, la invención también se refiere a ácido nucleicos que codifica tales Nanocuerpos y polipéptidos, a procedimientos para preparar tales Nanocuerpos y polipéptidos, a células huésped que expresan o capaces de expresar tales Nanocuerpos o polipéptidos, a usos de tales Nanocuerpos, polipéptidos, ácido nucleicos o células huésped, y a composiciones que comprenden tales Nanocuerpos, polipéptidos, ácido nucleicos o células huésped.

25 Generalmente, cabe mencionar que el término Nanocuerpo como se usa en la presente en su sentido más amplio no se limita a una fuente biológica específica o a un procedimiento específico de preparación. Por ejemplo, como se describirá en más detalle a continuación, los Nanocuerpos de la invención se pueden obtener (1) aislar el dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada natural; (2) por la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_{HH} natural; (3) por "humanización" (como se describe a continuación) de un dominio V_{HH} natural o por la expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio V_{HH} humanizado; (4) por "camelización" (como se describe a continuación) de un dominio VH natural de cualquier especie animal, en particular una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o por la expresión de un ácido nucleico que codifica tal dominio VH camelizado (5) por "camelización" de un "anticuerpo del dominio" o "Dab" como se describe en Ward et al (supra), o por la expresión de un ácido nucleico que codifica tal un dominio VH camelizado; (6) usando técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos; (7) por la preparación de un ácido nucleico que codifica un Nanocuerpo usando técnicas para la síntesis de ácido nucleico, seguido por la expresión del ácido nucleico así obtenida; y/o (8) por cualquier combinación de los precedentes. Los procedimientos y técnicas adecuados para realizar los precedentes serán evidentes para los expertos sobre la base de la descripción de la presente y por ejemplo, incluyen los procedimientos y técnicas descritos con más detalle más adelante en la presente.

40 Sin embargo, de acuerdo con una realización específica, los Nanocuerpos de la invención no tienen una secuencia de aminoácidos que sea exactamente igual (es decir, como un grado de identidad de secuencia de 100% con) la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural, tal como la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural de un mamífero, y en particular de un ser humano.

45 Una clase particularmente preferida de Nanocuerpos de la invención comprende los Nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} natural, pero que ha sido "humanizado", es decir, por el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de V_{HH} natural por uno o más de los residuos de aminoácidos que aparecen en la correspondiente posición en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (por ejemplo, indicado anteriormente). Esto se puede realiza de una manera conocida per se, que será evidente para los expertos, por ejemplo sobre la base de la siguiente descripción adicional y la técnica previa sobre la humanización denominado en la presente. Nuevamente, cabe mencionar que tales Nanocuerpos humanizados de la invención se pueden obtener de alguna manera adecuada conocida per se (es decir, como se indica bajo los puntos (1) - (8) anteriores) y en consecuencia no se limitan estrictamente a los polipéptidos que se han obtenido por medio de un polipéptido que comprende un dominio V_{HH} natural como un material de partida.

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

Otra clase particularmente preferida de Nanocuerpos de la invención comprende Nanocuerpos con una secuencia de

aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural que se ha "camelizado", es decir por el reemplazo de uno o más de residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional en uno o más de los residuos de aminoácidos que aparecen en las correspondientes posiciones de un dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada. Esto se puede realizar de una manera conocida per se, que será evidente para los expertos, por ejemplo sobre la base de la siguiente descripción adicional. También se hace referencia al documento WO 94/04678. Tal camelización puede ocurrir con preferencia en las posiciones de aminoácido que están presentes en la interfaz VH-VL y en los llamados residuos marcadores de Camelidae (ver por ejemplo, también el documento WO 94/04678), que también se menciona a continuación. Preferentemente, el dominio o secuencia de VH que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el Nanocuerpo camelizado es preferentemente una secuencia VH de un mamífero, más preferentemente la secuencia de VH de un ser humano. Sin embargo, cabe mencionar que tales Nanocuerpos camelizados de la invención se pueden obtener de alguna manera adecuada per se (es decir, indicad bajo los puntos (1) - (8) anterior) y en consecuencia no están estrictamente limitado a polipéptidos que han sido obtenidos mediante un polipéptido que comprende un dominio VH natural como un material inicial.

Por ejemplo, nuevamente como también se describe a continuación, tanto la "humanización" como la "camelización" se pueden realizar proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica tal dominio V_{HH} natural o dominio VH, respectivamente, y posteriormente cambiar de una manera conocida per se, uno o más codones de dicha secuencia de nucleótidos de modo que la nueva secuencia de nucleótidos codifica un Nanocuerpo humanizado o camelizado de la invención, respectivamente, y posteriormente que expresar la secuencia de nucleótidos así obtenida de una manera conocida per se de modo para proporcionar el Nanocuerpo deseado de la invención. Alternativamente, sobre la base de la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} o dominio VH natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos del Nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, se puede diseñar y posteriormente sintetizar de novo mediante técnicas para síntesis de péptidos conocidas per se. Asimismo, sobre la base de la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un dominio V_{HH} o dominio VH natural, respectivamente, una secuencia de nucleótidos que codifica el Nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, se puede diseñar y posteriormente sintetizar de novo mediante técnicas para síntesis de ácido nucleico conocidas per se, después de cual la secuencia de nucleótidos así obtenidas se puede expresar de una manera conocida per se para proporcionar el Nanocuerpo deseado de la invención.

Otras maneras y técnicas adecuadas para obtener los Nanocuerpos de la invención y/o las secuencias de nucleótidos y/o ácido nucleicos que codifican las mismas, a partir de (la secuencia de aminoácidos de) los dominios VH naturales o preferentemente los dominios V_{HH} y/o de las secuencias de nucleótidos y/o secuencias de ácidos nucleicos que codifican los mismos serán evidentes para los expertos, y por ejemplo, pueden comprender combinar una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos de los dominios VH naturales (tales como una o más FR y/o CDR) con una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos de los dominios V_{HH} naturales (tal como una o más FR o CDR), de una manera adecuada para proporcionar (una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica) un Nanocuerpo de la invención.

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

a) una secuencia de aminoácidos que está compuesta de cuatro regiones /secuencias estructurales interrumpidas por tres regiones /secuencias determinantes de complementariedad, en que el residuo de aminoácido de la posición 108 de acuerdo con la numeración de Rabat es Q; y/o

b) una secuencia de aminoácidos que está compuesta de cuatro regiones /secuencias estructurales interrumpidas tres regiones /secuencias determinantes de complementariedad, en que el residuo de aminoácido de la posición 44 de acuerdo con la numeración de Kabat es E y en que el residuo de aminoácido de la posición 45 de acuerdo con la numeración de Kabat es una R;

y/o

c) una secuencia de aminoácidos que está compuesta de cuatro regiones /secuencias estructurales interrumpidas tres regiones /secuencias determinantes de complementariedad, en que el residuo de aminoácido de la posición 103 de acuerdo con la numeración de Rabat se elige del grupo que consiste en P, R y S en particular se elige del grupo que consiste en R y S.

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

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que

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

y/o en que:

ii) el residuo de aminoácido de la posición 44 de acuerdo con la numeración de Kabat es E y en que el residuo de aminoácido de la posición 45 de acuerdo con la numeración de Kabat es R;

y/o en que:

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

y en que

iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente

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

10 FR- CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente,

y en que

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

15 y/o en que:

ii) el residuo de aminoácido de la posición 44 de acuerdo con la numeración de Kabat es E y en que el residuo de aminoácido de la posición 45 de acuerdo con la numeración de Kabat es una R;

y/o en que:

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

y en que

iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

25 En particular, de acuerdo con un aspecto preferido pero no limitante del aspecto de la invención, un Nanocuerpo se puede definir generalmente como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que está compuesta de cuatro regiones /secuencias estructurales interrumpidas tres regiones /secuencias determinantes de complementariedad, en que;

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

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

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

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

o en que:

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

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

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

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

o en que:

c-i) el residuo de aminoácido de la posición 44 de acuerdo con la numeración de Kabat se elige del grupo que

consiste en G, E, D, Q, R, S y L; y preferentemente se elige del grupo que consiste en G, E y Q; y

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

5 15 c-3) el residuo de aminoácido de la posición 103 de acuerdo con la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S; y en particular se elige del grupo que consiste en R y S; y

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

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

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

10 en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que:

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

y en que:

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

y en que:

iii) el residuo de aminoácido de la posición 103 de acuerdo con la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en W, R o S; y es preferentemente W o R, y con máxima preferencia es W;

20 y en que

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

10 y en que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

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

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que:

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

30 y en que:

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

y en que:

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

35 y en que:

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

y en que:

CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente

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

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a

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

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

y en que:

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

y en que:

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

10 y en que:

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

y en que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

15 Dos grupos particularmente preferidos, pero no limitantes de los Nanocuerpos de la invención son los que están de acuerdo con a) anterior; de acuerdo con 1) a a-4) anterior; de acuerdo con b) anterior; de acuerdo con b1) a b-4) anterior; de acuerdo con c) anterior; y/o de acuerdo con c-1) a c-4) anterior, en que;

a) los residuos de aminoácidos de las posiciones 44-47 de acuerdo con la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW o una secuencia tipo GLEW que se define más adelante) y el residuo de aminoácido de la posición 108 es Q;

20

o en que:

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

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

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

5 en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que:

i) los residuos de aminoácidos de las posiciones 44-47 de acuerdo con la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW (o una secuencia tipo GLEW que se define más adelante) y el residuo de aminoácidos de la posición 108 es Q;

30

y en que:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

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

35

FR1 - CDR - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que:

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

40

y en que

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

En los Nanocuerpos de la invención en que los residuos de aminoácidos de las posiciones 43-46 de acuerdo con la numeración de Kabat forman la secuencia KERE o KQRE, el residuo de aminoácido de la posición 37 con máxima preferencia es F. En los Nanocuerpos de la invención en que los residuos de aminoácidos de las posiciones 44-47 de

45

acuerdo con la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW, el residuo de aminoácido de la posición 37 se elige del grupo que consiste en Y, H, I, V o F, y con máxima preferencia es F.

En consecuencia, sin limitarse a estos de ninguna manera, sobre la base de los residuos de aminoácido presentes en las posiciones mencionadas anteriormente, los Nanocuerpos de la invención se puede clasificar generalmente sobre al

5

a) El "grupo GLEW": Nanocuerpos con la secuencia de aminoácidos GLEW en las posiciones 44-47 de acuerdo con la numeración de Kabat y Q en la posición 108 de acuerdo con la numeración de Kabat. Como también se describe en la presente, los Nanocuerpos de este grupo usualmente tienen una V en la posición 37, y pueden tener un W, P, R o S en la posición 103, y preferentemente tener un W en la posición 103. El grupo GLEW también comprende algunas

10

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

15

c) El "grupo 103 P, R, S": Nanocuerpos con un P, R o S en la posición 103. Estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de aminoácidos GLEW en las posiciones 44-47 de la numeración de Kabat o la secuencia de aminoácidos KERE o KERE en las posiciones 43-46 de acuerdo con la numeración de Kabat, esta última con máxima preferencia en combinación con una P en la posición 37 y una L o una P en la posición 47 (como se define para el grupo KERE); y puede tener Q o L en la posición 108 de acuerdo con la numeración de Kabat, y preferentemente tener Q.

20

En consecuencia, en otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede ser un Nanocuerpo perteneciente al grupo GLEW (como se define en la presente), y en que CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede ser un Nanocuerpo perteneciente al grupo KERE (como se define en la presente), y en que CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente:

25

En consecuencia, en otro aspecto preferido, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención puede ser un Nanocuerpo perteneciente al grupos 103 P, R, S (como se define en la presente), y en que CDR 1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

Asimismo, en forma más general y además de los residuos 108Q, 43E/44R y 103P,R,S mencionados anteriormente, los Nanocuerpos de la invención pueden contener, en una o más posiciones que, en un dominio VH convencional, pueden formar parte (parte de) de la interfaz VH/VL, contener uno más residuos de aminoácidos que están más altamente cargados que los residuos de aminoácidos que aparecen naturalmente en la misma posición en los correspondientes dominios VH y VL naturales; y en particular uno o más residuos de aminoácidos cargados (mencionados en la Tabla 1).

30

Tales sustituciones incluyen, pero sin limitación las secuencias tipo GLEW mencionadas en la siguiente Tabla 2; así como las sustituciones que se describen en la solicitud internacional WO 00/29004 para los llamados "microcuerpos", por ejemplo una Q en la posición 108 y KLEW en las posiciones 44-47.

35

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

Asimismo, en algunas realizaciones de los Nanocuerpos de la invención, el residuo de aminoácido de la posición 83 se elige del grupo que consiste en R, K, N, I y Q; y con máxima preferencia es K o E (para Nanocuerpos correspondientes a los dominios V_{HH} naturales) o R (para Nanocuerpos "humanizados", que se describen a continuación). El residuo de aminoácido de la posición 84 en algunas realizaciones se elige del grupo que consiste en P, A, R, S, D y V, y con máxima preferencia es P (para Nanocuerpos correspondientes a los dominios V_{HH} naturales) o R (para Nanocuerpos "humanizados", que se describen a continuación).

40

Además, en algunas realizaciones de los Nanocuerpos de la invención, el residuo de aminoácido de la posición 104 se elige del grupo que consiste en G y D; y con máxima preferencia es G.

45

En conjunto, los residuos de aminoácidos de las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108, que en los Nanocuerpos son como se mencionaron anteriormente, también se denominarán en la presente como "residuos Marcadores". Los residuos marcadores y los residuos de aminoácidos de las correspondientes posiciones del dominio VH humano más estrechamente relacionado, VH3, se sintetizan en la Tabla 2.

50

Algunas combinaciones especialmente preferidas de estos residuos marcadores que aparecen en los dominios V_{HH} naturales se mencionan en la Tabla 3. Para comparación, los correspondiente residuos de aminoácidos del VH3 humano llamado DP-47 se han indicado en *itálica*.

Tabla 2: residuos Marcadores en los Nanocuerpos

ES 2 384 164 T3

Posición	VH3 humano	residuos Marcadores
11	L, V; predominantemente L.	L, M, S, V,W; preferentemente L
37	V, I, F; usualmente V	Y, H, I o V, preferentemente o Y
44 ⁽²⁾	G	G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ , Q, R, S, L; preferentemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q; con máxima preferencia G ⁽²⁾ o E ⁽³⁾
45 ⁽²⁾	L	L ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ , C, I, L, P, Q, V; preferentemente L o R ⁽³⁾
47 ⁽³⁾	W, Y	W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾ , A, G, I, M, R, S o Y; preferentemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾ o R
83	R o K; usualmente R	R, K ⁽²⁾ , N, E ⁽¹⁾ , I, M o Q; preferentemente K o R; con máxima preferencia K
84	A,T,D; predominantemente A	P ⁽²⁾ , A, L, R, S, D, V; preferentemente P
103	W	W ⁽⁴⁾ , P ⁽⁶⁾ , R ⁽⁶⁾ , S; preferentemente W
104	G	G o D, preferentemente G
108	L, M o T predominantemente L	Q, L ⁽²⁾ o R, preferentemente Q o L ⁽²⁾

Notas:

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

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

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

(4): Con GLEW en las posiciones 44-47 y KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

15 (5): A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de los dominios V_{HH} naturales.

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

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

(8): El grupo GLEW también contiene secuencias tipo GLEW en las posiciones 44-47, tal como por ejemplo GVEW (SEQ ID NO: 460), EPEW (SEQ ID NO: 461), GLER (SEQ NO: 462), DQEW (SEQ E) NO: 463), DLEW (SEQ ID NO: 464), GIEW (SEQ ID NO: 465), ELEW (SEQ ID NO: 466), GPEW (SEQ ID NO: 467), EWLP (SEQ.ID NO: 468), GPER (SEQ ID NO: 469), GLER (SEQ ID NO: 470) y ELEW.

Tabla 3: Algunas combinaciones preferidas de los residuos marcadores en los Nanocuerpos naturales. Para la humanización de estas combinaciones, se hace referencia a la memoria especificativa.

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

En los Nanocuerpos, cada residuo de aminoácido en cualquier otra posición que los residuos Marcadores puede ser cualquier residuo de aminoácido que se producen naturalmente en la correspondiente posición (de acuerdo con la numeración de Kabat) de un dominio V_{HH} natural.

5 Tales residuos de aminoácidos serán evidentes para los expertos. Las Tablas 4 - 7 mencionan algunos residuos no limitantes que pueden estar presentes en cada posición (de acuerdo con la numeración de Kabat) de las FR1, FR2, FIR y FR4 de los dominios V_{HH} naturales. En cada posición, el residuo de aminoácido que aparece más frecuentemente en cada posición de un dominio V_{HH} natural (y que es el residuo de aminoácido más preferido para dicha posición en un Nanocuerpo) está indicado en negrita; y otros residuos preferidos de aminoácidos para cada posición se han subrayado (nota: el número de residuos de aminoácidos que se hallan en las posiciones 26-30 de los dominios V_{HH} naturales respalda la hipótesis subyacente de la numeración (supra) de que los residuos de estas posiciones ya forman parte de CDR1).
10

En las Tablas 4 - 7, también se han mencionado algunos de los residuos no limitantes que pueden estar presentes en cada posición de un dominio $VH3$ humano. Nuevamente, para cada posición, el residuo de aminoácido que aparece con más frecuencia en cada posición del dominio $VH3$ humano natural se indica en negrita; y otros residuos de aminoácidos preferidos se han subrayado.
15

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

Pos.	Residuos de aminoácidos:	
	<i>V_{H3} humano</i>	<i>V_{HH} camélido</i>
1	E, Q	Q, A, E, D, H, R
2	V	V, A, E, G, L, M, Q
3	Q	Q, K, E, H, P, R, Y
4	L	L, F, P, R, V
5	V, L	Q, E, L, V, M, P, A, I
6	E	E, D, Q, A, H
7	S, T	S, F, H
8	G, R	G, A, R
9	G	G, E
10	G, V	G, D, R, A, E, N, T, V
11	<u>Residuo marcador</u> : L, M, S, V, W, F, N, P, T, Y preferentemente L	
12	V, I	V, A, G, M
13	Q, K, R	Q, E, K, D, G, A, H, L, N, P, R, T
14	P	A, Q, A, G, P, T, V, E, F, I, N, S
15	G	G
16	G, R	G, A, E, D, N, P, R, S, V, W
17	S	S, E, T, N, P, A, C
18	L	L, V, M, Q, R
19	R, K	R, K, L, N, S, T, A, F, G, I, M, Q
20	L	L, E, I, V, M, S
21	S	S, F, T, G, H, P, A
22	C	C
23	A, T	A, D, P, S, T, V, E, G, I, L, Q, R
24	A	A, I, S, T, V, C, E, F, G, L, N, P, Q, Y

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

Pos.	Residuos de aminoácidos:	
	<i>V_{H3}</i> humano	<i>V_{HH}</i> camélido
25	S	S, A, F, P, T, L, V
26	G	G, D, E, R, S, V, A, I, M, P, T
27	F	S, F, R, L, P, G, N, A, D, E, H, I, K, M, Q, T, V, Y
28	T	N, T, E, D, S, I, R, A, G, R, F, Y, L, M, P, V
29	F, <u>V</u>	F, L, D, S, I, G, V, A, E, P, T, Y
30	S, <u>D</u> , G	N, S, E, G, A, D, M, T, H, I, P, R, V, W

Tabla 5: Ejemplos no limitantes de residuos de aminoácidos in FR2 (para las notas al pie, ver las notas al pie de Tabla 2)

Pos.	Residuos de aminoácidos:	
	<i>V_{H3}</i> humano	<i>V_{HH}</i> camélido
36	W	W
37	Hallmark residue: F ⁽¹⁾ , Y, H, I, A, L, P, S or V preferably F ⁽¹⁾ or Y	
38	R	R
39	Q	Q, H, P, R, A, D, G, L, E
40	A	A, F, G, P, T, V, I, L, N, R, S, Y
41	P, S, T	P, A, L, S, I, Q, T
42	G	G, E, D, R, T, V
43	K	K, D, E, N, Q, R, T, V, A, L, M, S
44	Residuo marcador: G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ , D, Q, R, S, L, A, F, K, M, N, P, V, W, Y; preferentemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q; con máxima preferencia G ⁽²⁾ o E ⁽³⁾ .	
45	Residuo marcador: L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , C, I, L, P, Q, V, D, E, G, H, K, T; preferentemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾ .	

46	E, V	E, D, K, Q, V, A, G, N
47	<u>Residuo marcador:</u> W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾ ; A, G, I, M, R, S, D, E, H, K, Q, T, V o Y; preferentemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ , F ⁽¹⁾ o R	
48	V	V, I, L, A, C, E, F, G, H, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
49	S, <u>A</u> , <u>G</u>	A, <u>S</u> , A, G, T, V, D, E, I, L, Q, R, Y

Tabla 6: Ejemplos no limitantes de residuos de aminoácidos in FR3 (para las notas al pie, ver las notas al pie a la Tabla 2)

Pos.	Residuos de aminoácidos:	
	<i>V_{H3} humano</i>	<i>V_{HH} camélido</i>
66	R	R
67	F	F, L, V, A, D, I, S, Y
68	T	T, A, S, D, F, G, I, K, N
69	I	I, M, V, A, F, L, R, S, T
70	S	S, A, F, E, G, K, P, T, V
71	R	R, G, I, K, Q, S, T, W, A, F, L, M, N
72	D, E	D, E, G, N, V, A, H, I, L, Q, S, T
73	N, <u>D</u> , <u>G</u>	N, D, F, I, K, S, T, Y, A, G, H, L, M, R, V
74	A, S	A, D, G, N, P, S, T, F, H, I, L, R, V, Y
75	K	K, A, E, K, L, N, Q, R, D, G, I, M, S, T, V, W
76	N, S	N, D, K, R, S, T, Y, E, G, H, I, Q
77	<u>S</u> , <u>I</u> , I	T, A, E, I, M, S, K, L, N, R, V
78	L, A	V, <u>L</u> , A, F, G, I, M, E, N, Q, R, S, T, W
79	Y, H	Y, A, D, F, H, S, T, C, E, I, L, N, V, W

80	L	L, F, V, M
81	Q	Q, E, R, T, G, H, I, K, L, M, N
82	M	M, I, L, V, G, P, T
82a	N, G	N, D, G, H, S, T, A, E, I, K, R, V
82b	S	S, N, D, G, R, A, C, E, F, I, K, M, P, T, V
82c	L	L, P, M, T, V
83	Residuo marcador: R, K ^(D) , N, E ^(D) , I, M, A, D, G, L, Q, S, T o I Q; preferentemente K o R con máxima preferencia K	
84	Residuo marcador: P ^(D) , A, L, R, S, D, V, F, G, H, N, T, Y; preferentemente P	
85	E, G	E, D, G, Q, A, N, R, V, Y
86	D	D, E, F, Y
87	T, M	T, S, A, C, M

Tabla 6: Ejemplos no limitantes de residuos de aminoácidos in FR3 (continuado)

Pos.	Residuos de aminoácidos:	
	<i>V_{H3} humano</i>	<i>V_{HH} camélido</i>
88	A	A, G, S, D, L, N, P
89	V, L	V, A, D, I, L, M, N, R, T, E, F, S
90	Y	Y, F, E, H, N
91	Y, H	Y, D, F, H, L, S, T, V, C, I, N, R, W
92	C	C
93	A, K, T	A, N, G, H, K, R, S, T, V, Y, E, F, I, L, M, Q
94	K, R, T	A, V, C, F, G, I, L, R, S, D, E, K, M, N, P, Q, T, W, Y T o K;

Tabla 7: Ejemplos no limitantes de residuos de aminoácidos in FR4 (para las notas al pie, ver las notas al pie en la Tabla 2)

Pos.	Residuos de aminoácidos:	
	<i>Human V_{H3}</i>	<i>Camelid V_{HH's}</i>
103	<u>Residuo marcador:</u> W ^(a) , P ^(b) , R ^(b) , S, F, G, K, L, N, Q, V, Y; preferentemente W	
104	<u>Residuo marcador:</u> G, A, R, S, T o D; preferentemente G	
105	Q, R	Q, E, K, P, R, G, H, L, S, V
106	G	G
107	T	T, A, I, N, P
108	<u>Residuo marcador:</u> Q, L ^(c) , E, H, N, P, T o R; o preferentemente Q o L	
109	V	V
110	T	T, I, A
111	V	V, A, I, G
112	S	S, F, A, L, P, T, Y
113	S	S, A, L, P, F, T

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

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4 respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que:

- i) los residuos marcadores son como se definieron anteriormente; y en que:
- ii) CDR2, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

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

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que:

- i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

15 [1] QVQLQESGGG \underline{X} VQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 1)

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

20 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la Tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o

supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

y en que:

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

[36] WXRQAPGKXXEXVA [49] [SEQ ID NO: 2]

5 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la anterior secuencia de aminoácidos; en que

10 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

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

15 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

20 y en que:

iii) FR.3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNKNTVYLQMNSLXXEDTSAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 3]

25 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con la anterior secuencia de aminoácidos; en que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

30 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

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

35 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

y en que:

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

40 [103] XXQGTXVTVSS [113] [SEQ ID NO: 4]

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

45 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 7; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

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

5 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 7; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

10 y en que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente en que los residuos Marcadores se indican con "X" y son como se definieron anteriormente en la presente y en los que los números entre corchetes se refieren a la posición del aminoácido de acuerdo con la numeración de Kabat.

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

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente,

y en que:

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

20 [1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 5)

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

25 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) el residuo Marcador en la posición es como se indica en la secuencia anterior;

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 4; y/o

35 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

el residuo Marcador en la posición como se indica en la secuencia anterior; y en que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencias de aminoácidos:

[36] WERQAPGKERELVA [49] [SEQ ID NO: 6]

40 [36] WERQAPGKEREFVA [49])[SEQ ID NO: 7]

[36] WERQAPGKEREGA [49] [SEQ ID NO: 8]

[36] WERQAPGKQRELVA [49] [SEQ ID NO: 9)

[36] WERQAPGKQREFVA [49] [SEQ ID NO: 10]

[36] WYRQAPGKGLEWA [49] [SEC ID NO: 1 i]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las anteriores secuencias de aminoácidos; en que

5 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 37, 44, 45 y 47 indicados en cada de una de las secuencias anteriores;

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 5; y/o

15 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

20 iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 12]

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

25 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) 5 y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

30 (3) los residuos Marcadores en las posiciones 83 y 84 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

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

35 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 83 y 84 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

40 iv) FR4 se elige del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos:

[103] WGQGTQVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 13]

[103] WGQGTLVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 14]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en

la presente) con una de las anteriores secuencias de aminoácidos; en que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

5 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y 5 sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

15 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido., en comparación con las anteriores secuencias; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

v) CDR1. CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente}

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

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que: y en que

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

25 **[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 5]**

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

30 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) el residuo Marcador en la posición como se indica en la secuencia anterior;

y en que:

35 ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencias de aminoácidos:

[36] WFRQAPGKERELVA [49]	[SEQ ID NO: 6]
[36] WFRQAPGKEREFVA [49]	[SEQ ID NO: 7]
[36] WFRQAPGKEREGA [49]	[SEQ ID NO: 8]
[36] WFRQAPGKQRELVA [49]	[SEQ ID NO: 9]
[36] WFRQAPGKQREFVA [49]	[SEQ ID NO: 10]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" (como se

define en la presente) con una de las anteriores secuencias de aminoácidos, en que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido .en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 5; y/o

5 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

10 iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 12]

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

15 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 83 y 84 son como se indica en cada una de secuencias anteriores;

20 y en que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en la secuencias de aminoácidos:

[103] WGQGTQVTVSS [113] [SEQ ID NO: 13]

[103] WGQGTLVTVSS [113] [SEQ ID NO: 14]

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

25 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 7; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

30 (3) los residuos Marcadores en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

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

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

35 en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que: y en que

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

[1] QVQLQESGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 5]

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

5 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) el residuo Marcador en la posición es como se indica en la secuencia anterior;

y en que:

10 ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[36] WYRQAPGKGLEWA [49]

[SEQ ID NO: 11]

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

15 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y 5 sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

20 (3) los residuos Marcadores en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

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

[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVVYCAA [94]

[SEQ ID NO: 12]

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

30 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 83 y 84 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

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

[103] WGQGTQVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 13]

35 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tiene, 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) con una de las anteriores secuencias de aminoácidos, en que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente o una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 7; y/o

40 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 103, 1 04 y 108 son como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente.

5 Algunas otras secuencias estructurales que pueden estar presentes en los Nanocuerpos de la invención se pueden hallar en la Patente Europea EP 656 946 mencionada anteriormente (ver por ejemplo, también la US concedida equivalente 5.759.808).

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

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

10 en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que: y en que

i) FR1 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR1 presentes en los Nanocuerpos de la SEQ ID No 52 a 60, SEQ U) NOs 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99, y en particular los Nanocuerpos humanizados de la SEQ ID NOs 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99,

15 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR1; en que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia de FR1; y

(3) el residuo Marcador en la posición es como se indica en dicha secuencia de FR1; y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tiene 3, 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR1, en que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia de FR1; y

(3) el residuo Marcador en la posición es como se indica en dicha secuencia de FR1;

y en que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR2 presentes en los Nanocuerpos de las SEQ ID NOs 52 a 60, SEQ NOs 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de la SEQ ID NOs 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99,

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 20 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR2; en que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente)

y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia de FR2; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indica en dicha secuencia FR2;

45 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencias de aminoácido" (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR2, en que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente

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

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia de FR2; y

5 (3) los residuos Marcadores en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son como se indican en dicha secuencia de FR2;

y en que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR3 presentes en los Nanocuerpos de la SEQ ID NOs 52 a 60, SEQ ID NOs 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de la SEQ ID NOs 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99,

10 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR3; en que (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

15 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia de FR3; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 83 y 84 como se indican en dicha secuencia de FR3;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tiene, 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR3, en que:

20 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia de FR3; y

25 (3) los residuos Marcadores en las posiciones 83 y 84 are como se indica en dicha secuencia de FR3;

y en que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR4 presentes en los Nanocuerpos de la SEQ ID NOs 52 a 60, SEQ ID NOs 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99, y en particular en los Nanocuerpos humanizados de la SEQ No 76 a 86 o SEQ ID NOs 95 a 99,

30 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR4; en que

35 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia de FR4; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 103, 104 y 108 son como se indican dicha secuencia de FR4;

40 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tiene, 2 o solo 1 "diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) con una de dichas secuencias de FR4, en que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en la Tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y

45 sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con dicha secuencia FR4; y

(3) los residuos Marcadores en las posiciones 103, 304 y 108 son como se indica en dicha secuencia de FR4;

y en que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son como se definieron anteriormente, y son preferentemente definidas de acuerdo con una de las definiciones preferidas anteriores y más preferentemente son como se definieron de acuerdo con una de las definiciones anteriores más preferidas.

5 Algunos nanocuerpos particularmente preferidos de la invención se pueden elegir de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nos 52, 76, 77, 95 y 96 y en particular los Nanocuerpos humanizados de la SEQ ID 76 y 77 o SEQ ID NOs 95 y 96 del grupo que consiste en aminoácido secuencias que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID Nos 52, 76, 77, 95 y 96; en que

(1) los residuos Marcadores se pueden indicar como en la Tabla 2 anterior;

10 (2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido como se define en las Tablas 4-7; y/o

(3) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos,

15 Algunos nanocuerpos aun más particularmente preferidos de la invención se pueden elegir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID Nos 52, 76, 77, 95 y 96 y en particular de los Nanocuerpos de la SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID Nos 95 a 99 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 130%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO SEQ ID Nos
20 52, 76, 77, 95 y 96; en que

(1) los residuos Marcadores son como se indican en la secuencia pertinente elegida de las SEQ ID Nos 52, 76, 77, 95 y 96;

25 (2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición Marcadora es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente) y/o una sustitución de aminoácido que se define en las Tablas 4-7; y/o

(3) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con la secuencia pertinente elegida de las SEQ ID Nos 52, 76, 77, 95 y 96.

30 Algunos de los Nanocuerpos más preferidos de la invención se pueden elegir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO ID Nos 52, 76, 77, 95 y 96, y en particular de los nanocuerpos de la SEQ ID No ID Nos 76, 77, 95 y 96.

Como será evidente a partir de lo anterior, el término Nanocuerpos de la invención como se usa en la presente en su sentido más amplio también comprende mutantes, variantes, alelos, análogos y ortólogos naturales o sintéticos (de aquí en adelante denominado colectivamente como "análogos") de los Nanocuerpos mencionados en las SEQ ID No 52, 76, 77, 95 y 96.

35 Generalmente, tales análogos por ejemplo pueden comprender secuencias homólogas, porciones funcionales, o una porción funcional de una secuencia homóloga (que también se define más adelante) de un Nanocuerpo. Generalmente, en tales análogos, cada residuo de aminoácido (diferente del residuo Marcador) en cada una de las regiones estructurales se puede reemplazar con otro residuo de aminoácido, con la condición de que el grado total de identidad de secuencia de las regiones estructurales permanece como se definió anteriormente. Preferentemente, sin embargo,
40 en tales análogos:

- uno o más residuos de aminoácidos en las anteriores secuencias estructurales se reemplazan con uno o más residuos de aminoácidos que se producen naturalmente en la misma posición en un dominio V_{HH} natural. Algunos ejemplos de tales sustituciones se mencionan en las Tablas 4-7 anteriores;

y/o:

45 - uno o más residuos de aminoácidos de las secuencias estructurales anteriores se reemplazan con uno o más residuos que se pueden considerar una sustitución "conservadora" de aminoácido, como se describió anteriormente en la presente;

50 - uno o más residuos de las anteriores secuencias estructurales se reemplazan con uno o más residuos de aminoácidos que aparecen naturalmente en la misma posición en un dominio VH natural de un ser humano, esto generalmente se denomina como "humanización" del V_{HH} /Nanocuerpo natural en general y de dicha posición en particular, y se discutirá con más detalle a continuación en la presente;

Y

posiciones en las cuales solo se menciona un residuo de aminoácido para el dominio VH y el dominio V_{HH} de las Tablas 4 – 7 anterior preferentemente no se reemplazan.

5 Asimismo, si bien generalmente se prefiere menos, en tales análogos, uno o más residuos de aminoácidos se pueden suprimir en las regiones estructurales y/o se insertan en las regiones estructurales (opcionalmente además a uno o más sustituciones de aminoácido como se mencionó anteriormente), con la condición que el grado total de identidad de secuencia de las regiones estructurales permanece como se definió anteriormente. Los residuos Marcadores no se deben suprimir. Asimismo, con máxima preferencia, los residuos de aminoácidos para los cuales solo un residuo de aminoácido se menciona para ambos el dominio VH y el dominio V_{HH} en las Tablas 4 - 7 anteriores preferentemente no se suprimen.

10 Preferentemente, tales análogos deben ser tales que se puedan unir a, tener afinidad por y/o tener especificidad por TNF-alfa, es decir, con una afinidad y/o una especificidad que es al menos 10%, preferentemente al menos 50%, más preferentemente al menos 70%, aun más preferentemente al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o más, de afinidad y/o especificidad de al menos uno de los Nanocuerpos, determinados mediante un ensayo adecuado, por ejemplo un ensayo para determinar la unión del análogo al TNF, y en particular uno de los
15 ensayos usados en los siguientes Ejemplos.

Generalmente, tales análogos por ejemplo se pueden obtener por la provisión de un ácido nucleico que codifica un dominio V_{HH} natural, cambio de los codones por uno o más residuos de aminoácidos que se humanizan en los codones para el correspondiente residuo de aminoácido humano, que expresa la secuencia de ácido nucleicos/nucleótidos así
20 obtenido en un huésped o sistema de expresión adecuado; y opcionalmente aislar y/o purificar el análogo así obtenido para proporcionar dicho análogo en forma esencialmente aislada (como se definió anteriormente en la presente). Generalmente esto se puede realizar mediante procedimientos y técnicas conocidas per se, que será evidente para los expertos, por ejemplo a partir de los manuales y referencias mencionadas en la presente y/o a partir de la siguiente descripción adicional en la presente. Alternativamente, y por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un análogo se puede sintetizar de una manera conocida per se (por ejemplo, mediante un aparato automatizado para sintetizar las
25 secuencias de ácidos nucleicos con una secuencia de aminoácidos predefinida) y puede expresar en un huésped o sistema de expresión adecuado, después de lo cual el análogo así obtenido opcionalmente se puede aislar y/o purificar de modo de proporcionar dicho análogo en forma esencialmente aislada (como se definió anteriormente en la presente). Otro modo de proporcionar los análogos involucrar la síntesis química de la secuencia pertinente de aminoácidos usando técnicas para síntesis de péptidos conocida per se, tal como los mencionados más adelante en la presente.

30 Generalmente también será evidente para los expertos que los Nanocuerpos (que incluyen sus análogos) también se pueden preparar a partir de las human secuencias de VH (es decir, secuencias de aminoácidos o las correspondientes secuencias de nucleótidos), tal como por ejemplo secuencias de VH3 tales como DP-47, DP-51, DP-54 o DP-29, por el cambio de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho dominio VH humano, de modo de proporcionar una secuencia de aminoácidos que tiene (a) un Q en la posición 108; y/o (b) E en la posición 44 y/o R
35 en la posición 45, y preferentemente E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) p, R o S en la posición 103, como se describió anteriormente. Nuevamente, esto se puede realizar generalmente mediante diversos procedimientos y técnicas mencionados en el párrafo previo, por medio de una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos para un dominio VH humano como punto de partida.

40 El término Nanocuerpos como se usa en la presente en su sentido más amplio también comprende partes o fragmentos de los Nanocuerpos (que incluyen análogos) de la invención como se definió anteriormente, que nuevamente también se puede describir mas adelante.

Generalmente, las partes o fragmentos de los Nanocuerpos y/o análogos tienen secuencias de aminoácidos en que, en comparación con la secuencia de aminoácidos del correspondiente Nanocuerpo o análogo de longitud completa, se ha suprimido y/o eliminado uno o más de los residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, uno o más residuos de
45 aminoácidos en el extremo C-terminal, uno o más residuos de aminoácidos internos contiguos, o cualquier combinación de estos. También es posible combinar una o más de estas partes o fragmentos para proporcionar un Nanocuerpo de la invención.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo que comprende uno o más partes o fragmentos de un Nanocuerpo y/o análogo de longitud completa debe tener un grado de identidad de secuencia de al menos 50%,
50 preferentemente al menos 60%, más preferentemente al menos 70%, tal como al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%, con la secuencia de aminoácidos del correspondiente Nanocuerpo de longitud completa.

Asimismo, la secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo que comprende uno o más partes o fragmentos de un Nanocuerpo y/o análogo de longitud completa es preferentemente tal que comprende al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, más preferentemente al
55 menos 30 residuos de aminoácidos contiguos, tal como al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, de la secuencia de aminoácidos del correspondiente Nanocuerpo de longitud completa.

Generalmente, tales partes o fragmentos de los Nanocuerpos de la invención tendrán secuencias de aminoácidos en que, en comparación con la secuencia de aminoácidos del correspondiente Nanocuerpo de longitud completa de la

invención, se han suprimido y/o eliminado uno o más de los residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, uno o más residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal, uno o más residuos de aminoácidos internos contiguos, o cualquier combinación de estos. También es posible combinar una o más de tales partes o fragmentos para proporcionar un Nanocuerpo de la invención.

5 De acuerdo con una realización preferida, un fragmento usado en la presente comprende al menos una de las CDR presentes en un Nanocuerpo de tamaño completo de la invención, preferentemente al menos dos de las CDR presentes en un Nanocuerpo de tamaño completo de la invención, más preferentemente al menos CDR2 y CDR3 presentes en un Nanocuerpo de tamaño completo de la invención, tal como por ejemplo las tres CDR presentes in a Nanocuerpo de tamaño completo de la invención.

10 De acuerdo con otra realización particularmente preferida, pero no limitante, tal parte o fragmento comprende al menos FR3, CDR3 y FR4 del correspondiente Nanocuerpo de longitud completa de la invención, es decir como se describe por ejemplo en la Solicitud internacional WO 03/050531 (Lasters et al.).

15 Preferentemente, tales partes o fragmentos deben ser de modo tal que se puedan unir a, tener afinidad por y/o tener especificidad por TNF-alfa, es decir con una afinidad y/o una especificidad que es al menos 10%, preferentemente al menos 50%, más preferentemente al menos 70%, incluso más preferentemente al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o más, de la afinidad y/o especificidad del correspondiente Nanocuerpo de tamaño completo de la invención, por ejemplo, en un ensayo para determinar la unión del análogo a TNF, y en particular uno de los ensayos usados en los siguientes Ejemplos.

20 A partir de la descripción anterior de la presente, será evidente que la secuencias de aminoácidos de los Nanocuerpos usado en la presente difieren en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones estructurales de las secuencias de aminoácidos de dominios VH naturales, tales como la secuencias de aminoácidos de los dominios VH naturales de los anticuerpos de los seres humanos. En particular, será evidente que las secuencias de aminoácidos de los Nanocuerpos usado en la presente difieren en al menos uno de los residuos Marcadores de las secuencias de aminoácidos de los dominios VH naturales, tal como la secuencias de aminoácidos de los dominios VH naturales de anticuerpos de camélidos y/o seres humanos.

25 En consecuencia, de acuerdo con una realización específica, un Nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una posición de aminoácido en una de las regiones estructurales de la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural. De acuerdo con una realización más específica, pero no limitante de la invención, un Nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno de los residuos Marcadores de la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural.

30 A partir de la descripción anterior de la presente, también será evidente que las secuencias de aminoácidos de algunos de los Nanocuerpos de la invención, tal como los Nanocuerpos humanizados de la invención, diferirán en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones estructurales (es decir, en la posición de un residuo Marcador o en otra posición) de las secuencias de aminoácidos de los dominios V_{HH} naturales. En consecuencia, de acuerdo con una realización específica, pero no limitante, un Nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una posición de aminoácido en una de las regiones estructurales de la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} natural. De acuerdo con una realización más específica, pero no limitante de la invención, un Nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno de los residuos Marcadores de la secuencia de aminoácidos de dominio V_{HH} natural.

35 La invención en sentido más amplio también comprende derivados de los Nanocuerpos de la invención. Tales derivados generalmente se pueden obtener por la modificación, y en particular por la modificación química y/o biológica (por ejemplo, enzimática) de los Nanocuerpos de la invención y/o de uno o más de los residuos de aminoácidos que formar los Nanocuerpos de la invención.

40 Los ejemplos de tales modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia del nanocuerpo que se puede modificar de tal manera (es decir en el esqueleto de la proteína pero preferentemente en una cadena lateral), procedimientos y técnicas que se pueden usar para introducir tales modificaciones y los usos y ventajas potenciales de tales modificaciones serán evidentes para los expertos.

45 Por ejemplo, tal modificación puede involucrar la introducción (por ejemplo, por unión covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos, residuos o restos funcionales en el nanocuerpo de la invención, y en particular de uno o más grupos, residuos o restos funcionales que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas para el nanocuerpo de la invención. Ejemplo de tales grupos funcionales serán claros para los expertos.

50 Por ejemplo, tal modificación puede comprender la introducción (por ejemplo, por unión covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales que aumentan la vida media, la solubilidad y/o al absorción del nanocuerpo de la invención, que reducen la inmunogenicidad y/o la toxicidad del nanocuerpo de la invención, que eliminan o atenúan cualquier efecto secundarios no deseable del nanocuerpo de la invención, y/o que confieren otras propiedades ventajosas y/o reducen las propiedades no deseadas de los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención; o cualquier combinación de dos o más de los precedentes. Los ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para introducirlos serán evidentes para los expertos, y en general pueden comprender todos los grupos funcionales y

técnicas mencionadas en los antecedentes generales de la técnica mencionado anteriormente en la presente así como los grupos funcionales y técnicas conocidas per se para la modificación de proteínas farmacéuticas, y en particular para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (que incluyen ScFv y anticuerpos de dominio único), para los cuales se hace referencia por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Tales grupos funcionales por ejemplo se pueden unir directamente (por ejemplo, en forma covalente) a un Nanocuerpo de la invención, u opcionalmente por medio de un ligador o espaciador adecuado, como nuevamente será evidente para los expertos.

Una de las técnicas más ampliamente usadas para aumentar la vida media y/o la reducción de la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) o sus derivados (tal como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). Generalmente, se pueden usar cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica para los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (que incluyen pero sin limitación anticuerpos de dominio único) y ScFv); se hace referencia por ejemplo en Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); por Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), por Hans y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en WO 04/060965. Varios reactivos para la pegilación de proteínas también están disponibles en el comercio, por ejemplo, en Nektar Therapeutics, USA.

Preferentemente, se usa la pegilación dirigida al sitio, en particular por medio de un residuo de cisteína (ver por ejemplo Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este fin, el PEG se puede unir a un residuo de cisteína que aparecen naturalmente en un Nanocuerpo de la invención, un Nanocuerpo de la invención se puede modificar de modo de introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG se puede fusionar al extremo N-y/o C-terminal de un Nanocuerpo de la invención, por medio del uso de las técnicas de ingeniería de proteínas conocida per se por los expertos.

Preferentemente, para los Nanocuerpos y proteínas de la invención, se usa un PEG con un peso molecular de más de 5000, tal como más de 10.000 y menos de 200.000, tal como menos de 100.000; por ejemplo en el rango de 20.000-80.000.

Con respecto a la pegilación, cabe mencionar que generalmente, la invención también abarca cualquier Nanocuerpo de la invención y/o polipéptido de la invención que ha sido pegilado en una o más posiciones de aminoácido, preferentemente de manera que dicha pegilación (1) aumenta la vida media in vivo; (2) reduce la inmunogenicidad; (3) proporciona una o más propiedades beneficiosas conocidas per se para la pegilación; (4) no afecta esencialmente la afinidad del nanocuerpo y/o polipéptido para TNF-alfa (por ejemplo no reduce dicha afinidad en más de 90%, preferentemente no en más de 50%, y más preferentemente no en más de 10%, determinado por un ensayo adecuado, tal como los descritos en los siguientes Ejemplos); y/o (4) no afecta ninguna de las otras propiedades deseadas de los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención. Los grupos PEG y procedimientos adecuados para unirlos, sea en forma específica o no específica, será evidente para los expertos. Los kits y reactivos adecuados para tal pegilación por ejemplo, se pueden obtener en Nektar (CA, USA).

Otra modificación, usualmente menos preferida comprende glicosilación ligada a N o ligada a O, usualmente como parte de la modificación co-traducción y/o pos-traducción, dependiendo de la célula huésped usada para expresar el nanocuerpo o polipéptido de la invención.

Aún otra modificación puede comprender la introducción de una o más marcas detectables u otros grupos o restos generadores de señal, de acuerdo con el uso deseado del Nanocuerpo marcado. Las marcas detectables y técnicas para fijarlas, usarlas y detectarlas serán evidentes para los expertos, y por ejemplo incluyen, pero sin limitación, marcas fluorescentes (tal como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina y metales fluorescentes tales como ¹⁵²Eu u otros metales de la serie lantánido), marcas fosforescentes, marcas quimioluminiscentes o marcas bioluminiscentes (tal como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radio-isótopos (tal como ³H, ¹²⁵I, ³²P, ³²S, ¹⁴C, ⁵⁷Cr, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, y ⁷⁵Se), metales, quelatos de metales o cationes metálicos (por ejemplo cationes metálicos tales como ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹³¹I, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, y ⁶⁸Ga u otros metales o cationes metálicos que son particularmente adecuados para usar en el diagnóstico y análisis por imágenes in vivo, in vitro o in situ, tal como (¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Cr, y ⁵⁶Fe), así como cromóforos y enzimas (tales como malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, isomerasa delta-V-esteroide, alcohol deshidrogenasa de levadura, glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotinavidina peroxidasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa). Otras marcas adecuadas serán evidentes para los expertos, y por ejemplo incluyen restos que se pueden detectar por espectroscopia RMN o ESR.

Tales Nanocuerpos y polipéptidos marcados de la invención por ejemplo se pueden usar en ensayos in vitro, in vivo o in situ (que incluyen inmunoensayos conocidos per se tal como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos sándwich", etc.) así como con fines diagnósticos y de análisis por imágenes in vivo, que dependen de la elección de la marca específica.

Como será evidente para los expertos, otra modificación puede involucrar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo para quelar uno de los metales o cationes metálicos mencionados anteriormente. Los grupos quelantes

adecuados por ejemplo incluyen, sin limitación, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

5 Aún otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que es una parte de un par de unión específica, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Tal grupo funcional se puede usar para unir el nanocuerpo de la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de unión, es decir, mediante la formación del par de unión. Por ejemplo, un Nanocuerpo de la invención se puede conjugar a biotina, y unir a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado a avidina o estreptavidina. Por ejemplo, tal Nanocuerpo conjugado se puede usar como indicador, por ejemplo en un sistema diagnóstico donde un agente que produce una señal detectable se conjuga a avidina o estreptavidina. Tales pares de unión por ejemplo también se pueden usar para unir el nanocuerpo de la invención a un portador, que incluye los portadores adecuados para fines farmacéuticos. Uno ejemplo no limitante son las formulaciones liposómicas descritas por Cao y Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000). Tales pares de unión también se pueden usar para unir un agente terapéuticamente activo al nanocuerpo de la invención.

15 En algunas aplicaciones, en particular en las aplicaciones en que desea destruir una célula que expresa el blanco contra el que se dirigen los Nanocuerpos de la invención (por ejemplo, en el tratamiento del cáncer), o para reducir o lentificar el crecimiento y/o proliferación de tal célula, los Nanocuerpos de la invención también se pueden ligar a una toxina o a un residuo o resto tóxico. Los ejemplos de restos, compuestos o residuos tóxicos que se pueden unir a un Nanocuerpo de la invención para proporcionar - por ejemplo - un compuesto citotóxico serán evidente para los expertos y por ejemplo se pueden hallar en la técnica previa citada anteriormente y/o en la adicional descripción de la presente. Un ejemplo es la llamada tecnología ADEPT™ del documento WO 03/055527.

Otras potenciales modificaciones químicas y enzimáticas serán evidentes para los expertos. Tales modificaciones también se pueden introducir para fines de investigación (por ejemplo para estudiar las relaciones función-actividad). Se ha referencia por ejemplo en Lundblad y Bradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 143-151 (1997).

25 Como se mencionó anteriormente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que comprenden al menos un dominio V_{HH} (es decir, que se identifica por medio de los procedimientos de la invención) o al menos un Nanocuerpo basado en este.

30 De acuerdo con una realización no limitante de la invención, tal polipéptido de la invención consiste esencialmente en un Nanocuerpo. POr "consiste esencialmente en" se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención es exactamente la misma que la secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo (como se mencionó anteriormente) o corresponde a la secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo en que se ha añadido un número limitado de residuos de aminoácidos, tal como 1-10 residuos de aminoácidos y preferentemente 1-6 residuos de aminoácidos, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos, al extremo amino terminal, al extremo carboxi terminal, o al extremo amino terminal y al extremo carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo.

35 Dichos residuos de aminoácidos pueden cambiar o no, alterarse o influir de otro modo en las propiedades (biológicas) del nanocuerpo y pueden añadirse o no funcionalidad adicional al nanocuerpo. Por ejemplo, tales residuos de aminoácidos:

a) pueden comprender un residuo Met N-terminal, por ejemplo como resultado de la expresión en una célula huésped u organismo huésped heterólogo.

40 b) pueden formar una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción del nanocuerpo desde una célula huésped después de la síntesis. Los péptidos líderes secretores serán evidentes para los expertos, y también se pueden describir en la presente. Usualmente, tal secuencia líder se unirá al extremo N-terminal del nanocuerpo, si bien la invención en su sentido más amplio no se limita a este;

45 c) puede formar una secuencia o señal que permite dirigir el nanocuerpo hacia y/o penetrar o entrar en órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos de células específicos y/o que permite que el nanocuerpo penetre o atraviese una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células epiteliales, un tumor que incluye tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de tales secuencias de aminoácidos serán evidentes para los expertos. Algunos ejemplos no limitantes son los vectores de péptido pequeño ("vectores Pep-trans") descritos en el documento WO 03/026700 y en Tamsamani et al., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 1, 773 (2001); Tamsamani y Vidal, *Drug Discov. Today*, 9, 1012 (004) y Rousselle, J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 296, 124-131 (2001), y la secuencia translocadora de membrana descrita por Zhao et al., *Apoptosis*, 8, 631-637 (2003). Las secuencias de de aminoácidos C-terminal y N-terminal para el direccionamiento intracelular de los fragmentos de anticuerpos por ejemplo, se describen en Cardinale et al., *Methods*, 34, 171 (2004). Otras técnicas adecuadas para el direccionamiento intracelular involucran la expresión y/o use de los llamados "intracuerpos" que comprenden un Nanocuerpo de la invención, que se menciona a continuación;

55 d) puede formar una "marca", por ejemplo una secuencia de aminoácidos o residuo que permite o facilita la purificación del nanocuerpo, por ejemplo, mediante técnicas de afinidad dirigidas contra dicho secuencia o residuo. A partir de este momento, dicha secuencia o residuo se puede eliminar (por ejemplo, por escisión química o enzimática) para proporcionar la secuencia del nanocuerpo (por este propósito, la marca opcionalmente se puede ligar a la secuencia del

nanocuerpo por medio de una secuencia ligadora escindible o contener un motivo escindible). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales residuos son múltiples residuos de histidina, residuos de glutatión y una marca myc tal como AAAEQKLISEEDLNGAA (SEQ ID NO:4761;

5 e) puede ser uno o más residuos de aminoácidos que han sido funcionalizados y/o que pueden actuar como un sitio de unión de los grupos funcionales. Los residuos e aminoácidos y grupos funcionales adecuados serán evidente para los expertos e incluyen, pero sin limitación, los residuos de aminoácidos y grupos funcionales mencionados en la presente para los derivados de los Nanocuerpos de la invención.

10 De acuerdo con otra realización, un polipéptido de la invención comprende un Nanocuerpo de la invención, que se fusiona en su extremo amino terminal, a su extremo carboxi terminal, o tanto en su extremo amino terminal como en su extremo carboxi terminal a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, es decir para proporcionar una proteína de fusión que comprende dicho Nanocuerpo de la invención y la una o más secuencias de aminoácidos adicionales. Tal fusión también se denominará en la presente como "fusión del Nanocuerpo".

15 La una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos adecuada y/o deseada. Las secuencias de aminoácidos adicionales pueden o no cambiar, alterarse o influir de otro en las propiedades (biológicas) del nanocuerpo, y pueden o no añadir funcionalidad adicional al nanocuerpo o el polipéptido de la invención. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos adicional es tal que confiere una o más propiedades o funcionalidades deseadas al nanocuerpo o el polipéptido de la invención.

20 Los ejemplos de tales secuencias de aminoácidos serán evidentes para los expertos, y generalmente pueden comprender todas las secuencias de aminoácidos que se usan en las fusiones peptídicas basadas en los anticuerpos convencionales y sus fragmentos (que incluyen pero sin limitación ScFv y anticuerpos de dominio único). Se hace referencia por ejemplo a la revisión de Holliger y Hudson, 31) Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005),

25 Por ejemplo, secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia de aminoácidos que aumenta la vida media, la solubilidad o la absorción, reduce la inmunogenicidad o la toxicidad elimina o atenúa los efectos secundarios no deseables y/o confiere otras propiedades ventajosas y/o reduce las propiedades no deseadas de los polipéptidos de la invención, en comparación con el nanocuerpo de la invención per se. Algunos ejemplos no limitantes de tales secuencias de aminoácidos son las proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana (ver por ejemplo el documento WO 00/27435) o moléculas hapténicas (por ejemplo haptenos que son reconocidos por los anticuerpos circulantes, ver por ejemplo el documento de WO 98/22141).

30 Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden proporcionar un segundo sitio de unión, tal sitio de unión puede ser dirigido contra cualquiera proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo deseado (que incluyen pero sin limitación la proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo igual contra el cual se dirige el nanocuerpo de la invención o una proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo diferente). Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos adicionales pueden proporcionar un segundo sitio de unión que se dirige contra una proteína sérica (tal como, por ejemplo, albúmina sérica humana u otra proteína sérica tal como IgG), de modo de proporcionar un aumento de la vida media en suero. Se hace referencia por ejemplo en los documentos EP 0 368 684, WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 04/003019 (en que se mencionan varias proteínas séricas), la Solicitud internacional por el solicitante titulada "Nanobodies™ against amyloid-beta and polypeptides comprising the same for the treatment degenerative neural diseases such as Alzheimer's disease" (en que se mencionan varias proteínas diferentes), así como en Hamsen et al., Vaccine, 23 (41); 4926-42.

40 De acuerdo con otra realización, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden comprender una o más partes, fragmentos o dominios de los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (y en particular anticuerpos humanos) y/o de anticuerpos de cadena pesada. Por ejemplo, si bien se prefiere menos, un Nanocuerpo de la invención se puede unir a un dominio VH o VL convencional (preferentemente humano) o a un análogo natural o sintético de un dominio VH o VL, otra vez, opcionalmente por medio de una secuencia ligadora (que incluye pero sin limitación otros anticuerpos de dominio (único), tal como el dAb descrito por Ward et al.).

45 Al menos un Nanocuerpo también se puede unir a uno o más dominios CH1, CH2 y/o CH3 (preferentemente humanos) opcionalmente por medio de una secuencia ligadora. Por ejemplo, un Nanocuerpo ligado a un dominio CH1 adecuado por ejemplo se puede usar – juntos con las cadenas livianas adecuadas – para generar fragmentos/estructuras de anticuerpos análogas a los fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂ convencionales, pero en que uno o (en el caso de un fragmento de F(ab')₂) o ambos dominios VH convencionales han sido reemplazados por un Nanocuerpo de la invención. Asimismo, dos Nanocuerpos se pueden ligar a un dominio CH3 (opcionalmente por medio de un ligador) para proporcionar un constructo con aumento de vida media in vivo.

50 De acuerdo con una realización específica de un polipéptido de la invención, uno o más Nanocuerpos de la invención se pueden unir a una o más partes, fragmentos o dominios del anticuerpo que confieren una o más funciones efectoras al polipéptido de la invención y/o pueden conferir la capacidad de unir a uno o más receptores de Fc. Por ejemplo, para este fin, y sin limitación, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales puede comprender una o más dominios de CH2 y/o CH3 de un anticuerpo, tal como de un anticuerpo de cadena pesada (como se describe en la presente) y más preferentemente de un anticuerpo de 4 cadenas humano convencional; y/o puede formar (parte de) y la región Fc,

por ejemplo de IgG, de IgE o de otra Ig humana. Por ejemplo, el documento WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprenden un dominio V_{HH} de camélido o un derivado humanizado de este (es decir un Nanocuerpo), en que el dominio de CH2 y/o CH3 de Camelidae se ha reemplazado con dominios de CH2 y CH3 humanos, para proporcionar una inmunoglobulina que consiste en 2 cadenas pesadas que comprenden un Nanocuerpo y los dominios de CH2 y CH3 humanos (pero no el dominio CH1), tal inmunoglobulina tiene la función efectora provista por los dominios de CH2 y CH3 y tal inmunoglobulina puede actuar sin la presencia de ninguna cadena liviana. Otras secuencias de aminoácidos que se pueden usar de modo adecuado en los Nanocuerpos de la invención para proporcionar una función efectora serán evidentes para los expertos, y se pueden elegir sobre la base de las funciones efectoras deseadas. Se hace referencia por ejemplo en los documentos WO 04/058820, WO 99/42077 y WO 05/017148, así como en la revisión de Holliger y Hudson, supra. El acoplamiento de un Nanocuerpo de la invención a una porción de Fc también puede llevar a un aumento de la vida media, en comparación con el correspondiente Nanocuerpo de la invención. En algunas aplicaciones, el uso de una porción de Fc y/o de los dominios (es decir dominios de CH2 y/o CH3) que confieren aumento de la vida media sin ninguna función efectora biológicamente significativa también puede ser adecuado o incluso preferido. Otros constructos adecuados que comprenden uno o más Nanocuerpos y uno o más dominios constantes con aumento de la vida media in vivo serán evidentes para los expertos, y por ejemplo pueden comprender dos Nanocuerpos ligados a un dominio CH3, opcionalmente por medio de un secuencia ligadora. Generalmente, cualquier proteína de fusión o derivados con aumento de la vida media tendrá preferentemente un peso molecular de más de 50 kD, el valor límite para la absorción renal.

Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden formar una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción del nanocuerpo o el polipéptido de la invención desde una célula huésped después de la síntesis (por ejemplo, para proporcionar una forma pre-, pro- o prepro- del polipéptido de la invención, de acuerdo con la célula huésped usada para expresar el polipéptido de la invención).

Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden formar una secuencia o señal que permite que el nanocuerpo o polipéptido de la invención sea dirigido hacia y/o penetre o entre en órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos de células específicos y/o que permita que el nanocuerpo o polipéptido de la invención penetre o atraviese una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células epiteliales, un tumor que incluye tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de tales secuencias de aminoácidos serán evidentes para los expertos y por ejemplo incluyen, pero sin limitación, los vectores "Peptrans" mencionados anteriormente, las secuencias descritas por Cardinale et al. y la secuencias de aminoácidos y fragmentos de anticuerpos conocidas per se que se pueden usar para expresar o producir los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención llamados "intracuerpos", por ejemplo como se describe en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618, US-A-7004940, WO 03/014960, WO 99/07414; WO 05/01690; EP 1 512 696; y en Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170, y las referencias adicionales allí descritas.

En algunas aplicaciones, en particular en las aplicaciones en que desea destruir una célula que expresa el blanco contra el que se dirigen los Nanocuerpos de la invención (por ejemplo, en el tratamiento del cáncer), o para reducir o identificar el crecimiento y/o proliferación de tal célula, los Nanocuerpos de la invención también se pueden ligar a proteína o polipéptido (cito)tóxico. Los ejemplos de tales proteínas y polipéptidos tóxicos que se pueden ligar a un Nanocuerpo de la invención para proporcionar o -por ejemplo - un polipéptido citotóxico de la invención serán evidente para los expertos y por ejemplo se pueden hallar en la técnica previa citada anteriormente y/o en la adicional descripción de la presente. Un ejemplo es la llamada tecnología ADEPTTM del documento WO 03/055527.

De acuerdo con una realización no limitante, uno o más residuos de aminoácidos se pueden añadir a, insertar en y/o sustituir en la secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácidos específicos para la unión de un grupo PEG.

La eficacia de los agentes farmacéuticos de proteína depende de su potencia para neutralizar el blanco pero también de la farmacocinética intrínseca del fármaco potencial. Debido a que el riñón generalmente filtra las moléculas menores de 60.000 Dalton (Da), se han centrado esfuerzos para reducir la depuración al aumentar el peso molecular del agente biofarmacéutico a través de las fusiones de proteína (Syed et al., 1997), glicosilaciones o modificación con polímeros de polietilenglicol, es decir, PEGilación (Lee et al., 1999; Abuchowski et al., 1977; Nucci et al., 1991; Lecolley, et al. Chem Commun, 2004; Tao et al., J Am Chem Soc, 2004; Mantovani et al., 2005). Estos procedimientos extienden con éxito la exposición in vivo del agente biofarmacéutico.

Alternativamente, la vida media se puede extender por medio de otro agente pegilante, POLY PEG para la conjugación a los Nanocuerpos bivalentes, TNF56 o TNF55. POLY PEG son polímeros con forma de peine con dientes de PEG sobre un esqueleto metacrílico. Los POLY PEG pueden variar con la longitud de la cadena del PEG, en el esqueleto metacrílico y sobre el grupo terminal activo que determina el procedimiento de conjugación del POLY PEG en el nanocuerpo. La conjugación específica del sitio en la cisteína C-terminal presente en los Nanocuerpos se puede obtener a través del grupo terminar maleimida activo en el POLY PEG.

La invención también abarca cualquier Nanocuerpo de la invención y/o polipéptido de la invención que se ha glicosilado en una o más posiciones de aminoácido, usualmente de acuerdo con el huésped usado para expresar el nanocuerpo o polipéptido de la invención (que también se describe a continuación).

- De acuerdo con una realización no limitante, uno o más residuos de aminoácidos se pueden añadir a, insertar en y/o sustituir en la secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácidos específicos y/o un sitio que puede ser glicosilado por el organismo huésped usado. Por medio de un ejemplo preferido, pero no limitante, el residuo N d de la posición 50 dentro de CDR2 de un Nanocuerpo de la invención por ejemplo se puede reemplazar con un residuo Q, D o S para proporcionar un sitio de glicosilación, por ejemplo, para la glicosilación por Pichia.
- De acuerdo con otra realización, un polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo, que se fusiona en su extremo amino terminal, en su extremo carboxi terminal o tanto en su extremo amino terminal y como su extremo carboxi terminal con al menos una secuencia de aminoácidos adicional.
- Nuevamente, dichas secuencias de aminoácidos adicionales pueden o no cambiar, alterarse o influir de otro en las propiedades (biológicas) del nanocuerpo, y pueden o no añadir funcionalidad adicional al nanocuerpo.
- Por ejemplo, de acuerdo con una realización preferida, pero no limitante, dichas secuencias de aminoácidos adicionales pueden comprender al menos un Nanocuerpo adicional, para proporcionar un polipéptido de la invención que comprende al menos dos, tal como tres, cuatro o cinco Nanocuerpos, en que dichos Nanocuerpos opcionalmente pueden estar unidos por medio de una o más secuencias ligadoras (como se define en la presente).
- Los polipéptidos de la invención que comprenden dos o más Nanocuerpos también se denominarán en la presente como polipéptidos "multivalentes". Por ejemplo un polipéptido "bivalente" de la invención comprende dos Nanocuerpos, opcionalmente unidos por medio de una secuencia ligadora, mientras que un polipéptido "trivalente" de la invención comprende tres Nanocuerpos, opcionalmente unidos por medio de dos secuencias ligadoras; etc.
- En un polipéptido multivalente de la invención, los dos o más Nanocuerpos pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, los dos o más Nanocuerpos en una polipéptido multivalente de la invención:
- se pueden dirigir con el mismo antígeno, es decir contra las mismas partes o epitopes de dicho antígeno o contra dos o más partes o epitopes diferentes de dicho antígeno; y/o: - se puede dirigir con antígenos diferentes;
- o a combinación de estos.
- En consecuencia, un polipéptido bivalente de la invención por ejemplo:
- puede comprender dos Nanocuerpos idénticos;
 - puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido contra una primera parte o epitope de un antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido contra la misma parte o epitope de dicho antígeno o contra otra parte o epitope de dicho antígeno;
 - o puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno; mientras que un polipéptido trivalente de la invención por ejemplo:
 - puede comprender tres Nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos contra partes o epitopes iguales o diferentes del mismo antígeno;
 - puede comprender dos Nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos contra partes o epitopes iguales o diferentes del de un primer antígeno y un tercer Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente del dicho primer antígeno;
 - o
 - puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido contra a primer antígeno, un segundo Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno, y un tercer Nanocuerpo dirigido contra un tercer antígeno diferente de dicho primer y segundo antígeno,
- Los polipéptidos de la invención que contienen al menos dos Nanocuerpos, en que al menos un Nanocuerpo se dirige contra un primer antígeno y al menos un Nanocuerpo se dirige contra un segundo antígeno diferente del primer antígeno, también se denominarán como Nanocuerpos "multiespecífico". En consecuencia, un Nanocuerpo "bienespecífico" es un Nanocuerpo que comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y al menos un Nanocuerpo adicional dirigido contra un segundo antígeno, mientras que un Nanocuerpo "triespecífico" es un Nanocuerpo que comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno, al menos un Nanocuerpo adicional dirigido contra un segundo antígeno, y al menos un Nanocuerpo adicional dirigido contra un tercer antígeno; etc.
- Por consiguiente, en su forma más simple, un polipéptido bienespecífico de la invención es un polipéptido bivalente de la invención (como se define en la presente), que comprende un primer Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno, en que dicho primer y segundo Nanocuerpo opcionalmente pueden estar unidos por medio de una secuencia ligadora (como se define en la presente); mientras que un polipéptido triespecífico de la invención en su forma más simple es un polipéptido trivalente de la invención (como se define en la presente), que comprende un primer Nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno, un segundo

Nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno y un tercer Nanocuerpo dirigido contra un tercer antígeno, en que dicho primer, segundo y tercer Nanocuerpo opcionalmente pueden estar ligados por medio de una o más, y en particular una y más en particular dos, secuencia ligadoras.

5 Sin embargo, como será evidente a partir de la descripción anterior de la presente, la invención no se limita a estos, en el sentido que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender numerosos Nanocuerpos dirigidos contra dos o más antígenos diferentes.

Para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, así como al documento de EP 0 822 985.

10 En los polipéptidos de la invención, el uno o más Nanocuerpos y el uno o más polipéptidos se pueden unir directamente entre sí (como se describe, por ejemplo en el documento WO 99/23221) y/o se pueden unir entre sí por medio de uno o más espaciadores o ligadores adecuados, o alguna combinación de estos.

15 Los espaciadores o ligadores adecuados para usar en los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos serán evidentes para los expertos, y generalmente pueden ser cualquier ligador o espaciador usado en la técnica para unir secuencias de aminoácidos. Preferentemente, dicho ligador o espaciador es adecuado para usar en la construcción de proteínas o polipéptidos que están destinados para el uso farmacéutico.

20 Algunos espaciadores particularmente preferidos incluyen los espaciadores y ligadores que se usan en la técnica para unir fragmentos de anticuerpos o dominios de anticuerpo. Estos incluyen los ligadores mencionados en la técnica previa general citados anteriormente, así como por ejemplo los ligadores que se usan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos ScFv (en este aspecto, sin embargo, cabe indicar que, mientras que en los diacuerpos y en los fragmentos ScFv, la secuencia ligadora usada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permiten que los dominios de VH y VL pertinentes se unan para formar el sitio de unión al antígeno completo, no existe limitación particular sobre la longitud o la flexibilidad del ligador usado en el polipéptido de la invención, ya que cada Nanocuerpo por sí mismo forma un sitio de unión al antígeno completo).

25 Otros ligadores adecuados generalmente comprenden compuestos o polímeros orgánicos, en particular los adecuados para usar en las proteínas para uso farmacéutico. Por ejemplo, los restos de poli(etilenglicol) se han usado para ligar dominios de anticuerpo, ver por ejemplo el documento WO 04/081026.

30 También está dentro del alcance de la invención que los ligadores usados confieran una o más propiedades o funcionalidad favorables diferentes a los polipéptidos de la invención, y/o proporcionen uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la unión de los grupos funcionales (por ejemplo como se describe en la presente para los derivados de los Nanocuerpos de la invención). Por ejemplo, los ligadores que contiene uno o más residuos de aminoácidos cargados (ver Tabla A-3 anterior) pueden proporcionar mejores propiedades hidrófilas, mientras que los ligadores que forman o contienen epitopes o marcas pequeñas se pueden usar para los fines detección, identificación y/o purificación. Nuevamente, sobre la base de la descripción de la presente, los expertos podrán determinar los óptimos ligadores para usar en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

35 Finalmente, cuando se usan dos o más ligadores en los polipéptidos de la invención, estos ligadores pueden ser iguales o diferentes. Nuevamente, sobre la base de la descripción de la presente, los expertos podrán determinar los óptimos ligadores para usar en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

40 Los ligadores para usar en los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos serán evidentes para los expertos, y por ejemplo incluyen ligadores gly-ser, por ejemplo del tipo $(gly_x, ser_y)_z$, tal como (por ejemplo $(gly_4 ser)_3$ o $(gly_3 ser_2)_3$), como se describe en el documento WO 99/42077, regiones bisagra tales como las regiones bisagra de los anticuerpos de cadena pesada naturales o secuencias similares. Para otros ligadores adecuados, también se hace referencia en la técnica previa general citada anteriormente. Algunos ligadores particularmente preferidos se dan en las SEC. ID NOs 68 y 69.

Los ligadores también pueden proporcionar alguna funcionalidad al polipéptido multivalente o multiespecífico. Por ejemplo, los ligadores que ponen en contacto uno o más residuos de aminoácidos cargados (ver Tabla 1 anterior) pueden proporcionar mejores propiedades hidrófilas, mientras que los ligadores que forman o contienen epitopes o marcas pequeñas se pueden usar para fines de detección, identificación y/o purificación.

50 Como se menciona en la presente, en una proteína o polipéptido de la invención, los Nanocuerpos anti-TNF mencionados en la presente preferentemente se ligan de modo tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor de TNF que está mediado por dicho trímero TNF y/o la transducción de señal que está mediada por dicho entrecruzamiento del receptor; y/o de modo tal que la proteína o polipéptido es capaz de experimentar unión intramolecular en al menos dos sitios de unión del receptor TNF de un trímero TNF. Los ligadores adecuados son como se describen en la presente.

55 Como también se menciona en la presente, se puede evaluar si una proteína o polipéptido proporciona unión

intermolecular o extramolecular (al menos en forma inicial) por una cromatografía de exclusión por tamaño. Por cromatografía de exclusión por tamaño se pueden analizar los complejos de TNF-alfa y anticuerpos para determinar el número y la relación de las moléculas de anticuerpo y TNF-alfa del complejo. A partir de estos datos se puede deducir si se produce la unión inter- o intramolecular, que fue realizado por Santora y colegas (Santora, LC., et al, Anal Biochem. 2001) para establecer la estequiometría de la unión del anticuerpo monoclonal D2E7 (Humira) a TNF-alfa en diferentes relaciones de anticuerpo y blanco. A partir del peso molecular del complejo se concluyó que tres moléculas de anticuerpo se complejaron con tres trómeros de TNF, lo que indica de este modo que el anticuerpo se une en un modo intermolecular. Se realizaron experimentos similares con Nanocuerpos bivalentes, en que un ligador muy corto indujo la formación de complejos moleculares grandes, que se obtuvieron por enlaces intermoleculares. Sin embargo, los mismos constructos de Nanocuerpos bivalentes con ligadores más largos eluyeron de la columna de filtración en gel como complejos pequeños diferenciados, de este modo se demuestra que se formaron enlaces intramoleculares. En combinación con los datos del bioensayo, en que el ligador más largo que contiene el Nanocuerpo TNF1 tubo una potencia óptima (neutralización completa de la cantidad de TNF usado en el ensayo, es decir 10 pM), se puede concluir que la unión intramolecular del Nanocuerpo bivalente impide de modo eficiente el entrecruzamiento de dos receptores unidos a células y la activación del receptor asociado. Los anticuerpos monoclonales conocidos tales como Humira o Remicade no pueden formar tales enlaces intramoleculares, dejando siempre dos sitios de unión al receptor sobre la molécula de TNF trimérica en un cierto grado disponible para la interacción con el receptor unido a la célula, lo que se traduce en una neutralización menos potente medida en el bioensayo.

Alternativamente, se puede evaluar si una proteína o polipéptido proporciona unión intermolecular o extramolecular por cristalografía y/o modelado molecular (u otras técnicas in silico adecuadas). Un modelo de complejo de TNF30/TNF-alfa trimérico se generó sobre la base de la estructura del cristal del complejo de TNF1/TNF-alfa tipo salvaje monomérico. A partir de esta estructura, se modeló el constructo final de TNF30-ligador-ALB8-ligador-TNF30. El constructo de TNF30-ligador-ALB8-ligador-TNF30 se modeló a partir del trímero de TNF con dos moléculas de TNF30 unidas. Como la estructura del ALB8 no se conoce, se usó en cambio una tercera molécula de TNF30, que se colocó entre los otros dos Nanocuerpos a lo largo de la línea de entre N y C-terminal, Los 9 ligadores de aminoácido se añadieron posteriormente de modo manual.

El modelo se muestra en la Figura 62. Claramente, los 9 ligadores de aminoácido junto con el ALB8 proporcionan un espacio amplio para abarcar los aproximadamente 66 Å entre los dos dominios TNF30 unidos a ALB8 por sí mismo ya abarca 40 Å, y cada ligador puede abarcar otros ~27 Å en la conformación completamente extendida. Como resultado, el ALB8 tiene bastante flexibilidad de movimiento y no se espera que su unión a la albúmina pueda interferir mucho en la unión a TNF.

Más aún, es probable que los ligadores se puedan acortar sin afectar la avidéz, especialmente en el caso del ligador que es C-terminal de ALB8. Esto puede tener el efecto beneficioso de aumentar la unión al mismo trímero de TNF versus los trímeros de entrecruzamiento, porque la probabilidad de que el segundo TNF30 se asocie con un TNF diferente aumenta con la longitud del ligador.

Como también se describe en la presente, un polipéptido multiespecífico de la invención dirigido contra un antígeno deseado y contra al menos una proteína sérica, tal como las proteínas séricas mencionadas más adelante en la presente, y en particular contra albúmina sérica humana, puede mostrar el aumento de la vida media en el suero, en comparación con el correspondiente Nanocuerpo monovalente.

Como se mencionó anteriormente en la presente, los procedimientos descritos en la presente son particularmente adecuados para generar tales polipéptidos multivalentes o multiespecíficos de la invención.

En un polipéptido de la invención, el al menos un Nanocuerpo también se puede ligar a un dominio VH convencional o a un análogo natural o sintético de un dominio VH, opcionalmente por medio de una secuencia ligadora.

En un polipéptido de la invención, el al menos un Nanocuerpo también se puede ligar a un dominio VL o a un análogo natural o sintético de un dominio VL, opcionalmente por medio de una secuencia ligadora, para proporcionar un polipéptido de la invención que está en la forma análoga a un fragmento scFv convencional, pero que contiene un Nanocuerpo en vez de un dominio VH.

En un polipéptido de la invención, el al menos un Nanocuerpo también se puede ligar a uno o más de un dominio CH1, CH2 y/o CH3, opcionalmente por medio de una secuencia ligadora. Por ejemplo, un Nanocuerpo ligado a un dominio CH1 adecuado se puede usar por ejemplo – junto con cadenas livianas adecuadas – para generar fragmentos /estructuras de anticuerpos análogas a los fragmentos Fab o fragmentos F(ab') convencionales, pero en el que uno o (en el caso de un fragmento F(ab')₂) se han reemplazado uno o ambos de los dominios VH convencionales con un Nanocuerpo. Tales fragmentos también pueden ser heteroespecífico o biespecífico, es decir dirigido contra dos o más antígenos. Un Nanocuerpo ligado a dominios de CH2 y CH3 adecuados, por ejemplo derivado de camélidos se puede usar para formar un anticuerpo de cadena pesada mono específico o biespecífico. Finalmente, un Nanocuerpo ligado a dominios adecuados de CH1, CH2 y dominio CH3, por ejemplo derivados de un ser humano, se puede usar – junto con cadenas livianas adecuadas – para formar un anticuerpo que es análogo a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, pero en que se han reemplazado uno o ambos de los dominios VH convencionales por un Nanocuerpo.

Asimismo, además de uno o más Nanocuerpos, los polipéptidos de la invención también pueden contener grupos, restos o residuos funcionales, por ejemplo sustancias terapéuticamente activas, tal como las que se mencionan a continuación, y/o marcadores o marcas, tales como marcadores fluorescentes, isótopos, etc., que se describen adicionalmente más adelante en la presente.

5 Los Nanocuerpos de la invención, los polipéptidos de la invención, y ácido nucleicos que codifican los mismos, se pueden preparar de una manera conocida per se, como será evidente para los expertos a partir de la descripción adicional de la presente. Algunos procedimientos preferidos, pero no limitantes para preparar los Nanocuerpos, polipéptidos y ácido nucleicos incluye los procedimientos y técnicas mencionados anteriormente y/o que descritos adicionalmente más adelante en la presente.

10 Como será evidente para los expertos, un procedimiento particularmente útil para preparar un Nanocuerpo y/o un polipéptido de la invención generalmente comprende las etapas de:

- la expresión, en una célula huésped u organismo huésped adecuado (también denominado en la presente como un "huésped de la invención") o en otros sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifica dicho Nanocuerpo o polipéptido de la invención (también denominado en la presente como un "ácido nucleico de la invención"), opcionalmente seguido por:

15 - aislamiento y/o purificación del nanocuerpo o polipéptido de la invención así obtenido.

En particular, tal procedimiento puede comprender las etapas de:

- cultivar y/o mantener un huésped de la invención en condiciones tales que dicho huésped de la invención exprese y/o produzca al menos un Nanocuerpo y/o polipéptido de la invención; opcionalmente seguido por:

20 - aislar y/o purificar el nanocuerpo o polipéptido de la invención así obtenido.

Un ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de un ADN o ARN de cadena simple o doble, y está preferentemente en la forma de ADN de cadena doble. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser ADN genómico, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codón que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula huésped u organismo huésped deseado),

25 De acuerdo con una realización de la invención, el ácido nucleico de la invención es forma esencialmente aislada, como se definió anteriormente en la presente.

El ácido nucleico de la invención también puede estar en forma de, estar presente en y/o ser parte de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido o YAC, que nuevamente puede estar en forma esencialmente aislada.

30 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar u obtener de una manera conocida per se, sobre la base de la información de las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención dados en la presente, y/o se pueden aislar de una fuente natural adecuada. Para proporcionar los análogos, las secuencias de nucleótidos que codificas dominios V_{HH} naturales por ejemplo, se pueden someter a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifica dicho análogo. Asimismo, como será evidente para los expertos, para preparar un ácido nucleico de la invención, también varias secuencias de nucleótidos, tal como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un Nanocuerpo y por ejemplo los ácido nucleicos que codifican uno o más ligadores se pueden ligar entre sí de una manera adecuada.

35 Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la invención serán evidente para los expertos y por ejemplo, pueden incluir, pero sin limitación, síntesis de ADN automatizada; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias naturales y/o sintéticas (o dos o más partes de estas), introducción de mutaciones que llevan a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que se pueden digerir fácilmente y/o ligar mediante enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción de PCR mediante uno o mas cebadores "mal apareados", usando por ejemplo una secuencia de un GPCR natural como un molde. Estas y otras técnicas serán evidente para los expertos, y se hace referencia nuevamente a los manuales estándares tales como Sambrook et al, y Ausubel et al., mencionados anteriormente, así como a los siguientes Ejemplos.

40 El ácido nucleico de la invención también puede estar en la forma de, presente en y/o ser parte de un constructo genético, como será evidente para los expertos en la técnica. Tales constructos genéticos generalmente comprenden al menos un ácido nucleico de la invención que está opcionalmente unido a uno o más elementos de los constructos genéticos conocidos per se, tal como por ejemplo uno o más elementos regulatorios (tal como un promotor, potenciador, terminador, etc adecuado) y los elementos adicionales de los constructos genéticos denominados más adelante en la presente. Tales constructos genéticos que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención también se denominarán en la presente como "constructos genéticos de la invención".

45 Los constructos genéticos de la invención pueden ser de ADN o ARN, y preferentemente son ADN de cadena doble. Los constructos genéticos de la invención también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la

5 célula huésped u organismo huésped deseados, en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula huésped deseada o en una forma adecuada de replicación, mantenimiento y/o herencia independiente en el organismo huésped deseado. por ejemplo, los constructos genéticos de la invención pueden estar en la forma de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido, YAC, vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir un vector que puede proporcionar la expresión in vitro y/o in vivo (por ejemplo en una célula huésped, organismo huésped y/o sistema de expresión adecuado).

En una realización preferida pero no limitante, un constructo genético de la invención comprende

- a) al menos un ácido nucleico de la invención; conectado operativamente a
- b) uno o más elementos regulatorios, tal como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado;
- 10 c) y opcionalmente también
- d) uno o más elementos adicionales de los constructos genéticos conocidos per se;

15 en que los términos "elemento regulatorio", "promotor", "terminador" y "conectado operativamente" tienen sus significados usuales en la técnica (que también se describen a continuación); y en que dichos "elementos adicionales" presentes en los constructos genéticos por ejemplo, pueden ser secuencias UTR 3' o 5', secuencias líderes, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes indicadores y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficiencia de) la transformación o integración. Estos y otros elementos adecuados para tales constructos genéticos serán evidentes para los expertos, y por ejemplo pueden depender del tipo de constructo usado, la célula huésped u organismo huésped deseado; la manera que las secuencias de nucleótidos de la invención de interés se van a expresar (por ejemplo, por medio de expresión constitutiva, transitoria o inducible); y/o la técnica de transformación usada.

20 Preferentemente, en los constructos genéticos de la invención, dicho al menos un ácido nucleico de la invención y dichos elementos regulatorios, y opcionalmente dicho uno o más elementos adicionales, están "unidos operativamente" entre sí, por el cual se entiende generalmente que ellos están en relación funcional entre sí. Por ejemplo, se considera que un promotor está "unido operativamente" a una secuencia codificadora si dicho promotor es capaz de inicial o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o al expresión de una secuencia codificadora (en que dicha secuencia codificadora se debe entender que está "bajo el control de dicho promotor"). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótidos están unidas operativamente, estarán en la misma orientación y usualmente también en el mismo marco de lectura. Estas usualmente también están esencialmente contiguas, si bien esto también puede no ser necesario.

25 Preferentemente, los elementos regulatorios y adicionales de los constructos genéticos de la invención son de modo tal que sean capaces proporcionar su función biológica deseada en la célula huésped u organismo huésped deseado.

30 Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador deben ser "operables" en la célula huésped u organismo huésped deseado, por lo que se entiende que (por ejemplo) dicho promotor debe ser capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos - por ejemplo una secuencia codificadora - a la que se une operativamente (como se define en la presente).

35 Algunos promotores particularmente preferidos incluyen, pero sin limitación, promotores conocidos per se para la expresión en las células bacterianas, tales como los mencionados más adelante en la presente y/o los usados en los Ejemplos.

40 Un marcador de selección debe ser tal que permita - es decir en condiciones de selección apropiadas - distinguir las células huésped y/u organismos huésped que han sido transformados (con éxito) con la secuencia de nucleótidos de la invención de las células/organismos huésped que no sido transformadas (con éxito). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales marcadores son genes que proporcionan resistencia contra los antibióticos (tal como kanamicina o ampicilina), genes que proporcionan resistencia a la temperatura o genes que permiten la célula huésped u organismo huésped sea mantenida en ausencia de ciertos factores, compuestos y/o componentes alimenticios en el medio que son esenciales para la supervivencia de las células u organismos no transformados.

45 Una secuencia líder debe ser tal que - en la célula huésped u organismo huésped deseado - permita las modificaciones pos-traducción deseadas y/o tal que dirija el ARNm transcrito a una parte u organela celular deseada. Una secuencia líder también puede permitir la secreción del producto de expresión de dicha célula. Como tal, la secuencia líder puede ser cualquier pro-, pre-, o prepro-secuencia operable en la célula huésped u organismo huésped. Las secuencias líderes pueden no ser necesarias para la expresión en una célula bacteriana.

50 Un marcador de expresión o gen indicador debe ser tal que -en la célula huésped u organismo huésped - permita la detección de la expresión de (un gen o secuencia de nucleótidos presente) en el constructo genético. Un marcador de expresión opcionalmente también permite la localización del producto expresado, por ejemplo en una parte u organela de la célula específica y/o en (a) células, tejidos, órganos o partes específicas de este organismo multicelular. Tales genes indicadores también se pueden expresar como una fusión de la proteína con la secuencia de aminoácidos de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes incluyen proteínas fluorescentes tales como GFP.

- Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de promotores, terminadores y elementos adicionales adecuados incluyen los usados en los siguientes Ejemplos. En algunos ejemplos no limitantes (adicionales) de los promotores, marcadores de selección, secuencias líderes, marcadores de expresión y elementos adicionales que pueden estar presentes/usarse en los constructos genéticos de la invención - tales como terminadores, potenciadores de transcripción y/o traducción y/o factores de integración – se hace referencia a los manuales generales tales como Sambrook et al. y Ausubel et al. mencionados anteriormente, así como los ejemplos que se dan en los documentos WO 95/07463, WO 96/23810, WO 95/07463, WO 95/21191, WO 97/11094, WO 97/42320, WO 98/06737, WO 98/21355, US-A-6.207.410, US-A- 5.693.492 y EP 1 085 089. Otros ejemplos serán evidentes para los expertos. También se hace referencia a la técnica previa general mencionada anteriormente y las referencias adicionales citadas más adelante en la presente.
- 5 Los constructos genéticos de la invención generalmente se pueden proporcionar por la unión adecuada de las secuencias de nucleótidos de la invención a uno o más elementos adicionales descritos anteriormente, por ejemplo usando las técnicas descritos en los manuales generales tales como Sambrook et al. y Ausubel et al., mencionados anteriormente.
- 10 A menudo, los constructos genéticos de la invención se obtendrán por la inserción de una secuencia de nucleótidos de la invención en un vector (expresión) adecuado conocido per se. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de los vectores de expresión adecuados son los usados en los siguientes Ejemplos, así como los que se mencionan a continuación.
- 15 Los ácidos nucleicos de la invención y/o los constructos genéticos de la invención se pueden usar para transformar una célula huésped u organismo huésped. La célula huésped u organismo huésped puede ser cualquier célula o línea celular adecuada (fúngica, procariótica o eucariótica) o línea celular o cualquier organismo fúngico, procariótico o eucariótico adecuado, por ejemplo:
- 20 - una cepa bacteriana, que incluyen pero sin limitación cepas gram-negativas tales como cepas de *Escherichia coli*; de *Proteus*, por ejemplo de *Proteus mirabilis*; de *Pseudomonas*, por ejemplo de *Pseudomonas fluorescens*; y cepas gram-positivas tales como cepas de *Bacillus*, por ejemplo de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por ejemplo de *Streptomyces lividans*; de *Staphylococcus*, por ejemplo de *Staphylococcus carnosus*; y de *Lactococcus*, por ejemplo de *Lactococcus lactis*;
- 25 - una célula fúngica, que incluye pero sin limitación células de especies de *Trichoderma*, por ejemplo de *Trichoderma reesei*; de *Neurospora*, por ejemplo de *Neurospora crassa*; de *Sordaria*, por ejemplo de *Sordaria macrospora*; de *Aspergillus*, por ejemplo de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus sojae*; o de otros hongos filamentosos;
- 30 - una célula de levadura, que incluye pero sin limitación células de especies de *Saccharomyces*, por ejemplos de *Saccharomyces cerevisiae*; de *Schizosaccharomyces*, por ejemplo de *Schizosaccharomyces pombe*; de *Pichia*, por ejemplo de *Pichia pastoris* o de *Pichia methanolica*; de *Hansenula*, por ejemplo de *Hansenula polymorpha*; de *Kluyveromyces*, por ejemplo de *Kluyveromyces lactis*; de *Arxula*, por ejemplo de *Arxula adenivorans*; de *Yarrowia*, por ejemplo de *Yarrowia lipolytica*;
- 35 - una célula o línea celular anfibia, tal como *Xenopus oocytes*;
- una célula o línea celular derivada de insecto, tal como células/líneas celulares derivadas de lepidópteros, que incluyen pero sin limitación células de *Spodoptera SF9* y *Sf21* o células/líneas celulares derivadas de *Drosophila*, tales como células de *Schneider* y *Kc*;
- una planta o células de planta, por ejemplo en plantas de tabaco; y/o
- 40 - una célula o línea celular de mamífero, por ejemplo derivada de una célula o línea celular derivada de un ser humano, de los mamíferos que incluyen pero sin limitación células CHO, células BHK (por ejemplo, células BHK-21) y células o líneas celulares humanas tales células HeLa, COS (por ejemplo COS-7) y PER.C6;
- así como otros huéspedes o células huésped conocidos per se para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (que incluyen pero sin limitación anticuerpos de dominio (único) y fragmentos ScFv), que serán evidentes para los expertos. También se hace referencia en la técnica previa general citada anteriormente en la presente, así como por ejemplo en los documentos WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken et al., (1998), supra; Riechmann y Muyldermans, (1999), supra; van der Linden, (2000), supra; Thomassen et al., (2002), supra; Boosten et al., (2003), supra; Jo-esters et al., (2005), supra; y las referencias adicionales citadas en la presente.
- 45 Los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención también se pueden introducir y expresar en una uno o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo para fines profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como una terapia génica). Para este fin, las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden introducir en las células o tejidos de cualquier modo adecuado, por ejemplo como tal (por ejemplo, mediante liposomas) o después de que se han insertado en un vector de terapia génica adecuado (por ejemplo derivado de retrovirus tal como adenovirus, o parvovirus tal como virus adeno-asociados). Como también será evidente para los expertos, tal terapia génica se puede realizar in vivo y/o in situ en el cuerpo de un paciente por la administración de un ácido nucleico de la invención o un vector de
- 50 terapia génica adecuada que codifica los mismos al paciente o a células específicas o a un tejido u órgano específico
- 55

del paciente; o las células adecuadas (a menudo tomadas del cuerpo del paciente por tratar, tal como linfocitos explantados, aspirados de médula ósea o biopsias de tejido) se pueden tratar in vitro con una secuencia de nucleótidos de la invención y posteriormente se reintroducen de modo adecuado en el cuerpo del paciente. Todo esto se puede realizar mediante vectores de terapia génica, técnicas y sistemas de administración que son bien conocidos por los expertos, por ejemplo Culver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, N.Y. g. Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 1108-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91; (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, US 5.580.859; US 5.589.466 o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Por ejemplo, in situ expression of fragmnts ScFv (Afanasieva et al., Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) y de diacuerpos (Blanco et al., J. Immunol, 171, 1070-1077 (2003)) se han descrito en la técnica.

Para la expresión de los Nanocuerpos en una célula, también se pueden expresar como los llamados "intracuerpos", por ejemplo, que se describen en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618 y US-A-7004940; WO 03/014960; en Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-00.

Para la producción, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención por ejemplo también se pueden producir en la leche de animales transgénicos, por ejemplo en la leche de conejos, vacas, cabras u oveja (ver por ejemplo US-A-6.741.957, US-A-6.304.489 y US-A-6.849.992 para técnicas generales para introducir transgenes en mamíferos), en plantas o partes de plantas que incluyen pero sin limitación sus hojas, flores, frutas, semilla, raíces o tubérculos (por ejemplo en tabaco, maíz, soja o alfalfa) o en por ejemplo pupas del gusano de seda Bambyx mori.

Además, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención también se pueden expresar y/o producir en sistemas de expresión libres de células, y los ejemplos adecuados de tales sistemas serán evidentes para los expertos. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes incluyen la expresión en el sistema de germen de trigo; en lisados de reticulocitos de conejo; o en el sistema Zubay de E. coli.

Como se mencionó anteriormente, una de las ventajas del uso de Nanocuerpos es que los polipéptidos basados en estos se pueden preparar mediante la expresión en un sistema bacteriano adecuado, y los sistemas de expresión bacterianos, vectores, células huésped, elementos regulatorios, etc., serán evidentes para los expertos, por ejemplo a partir de las referencias citadas anteriormente. Sin embargo, se debe indicar que la invención en su sentido más amplio no se limita a la expresión en sistemas bacterianos.

Preferentemente, en la invención, se usa un sistema de expresión (in vivo o in vitro), tal como un sistema de expresión bacteriano, que proporciona los polipéptidos de la invención en una forma que es adecuada para uso farmacéutico, y tales sistemas de expresión nuevamente serán evidentes para los expertos. También será evidente para los expertos, que los polipéptidos de la invención adecuados para el uso farmacéutico se pueden preparar mediante técnicas para la síntesis de péptidos.

Para la producción en escala industrial, los huéspedes heterólogos preferidos para la producción (industrial) de Nanocuerpos o proteínas terapéuticas que contienen Nanocuerpos incluyen cepas de E. coli, Pichia pastoris, S. cerevisiae que son adecuadas para la expresión/producción/fermentación en gran escala, y en particular para la expresión/producción/fermentación de productos farmacéuticos en gran escala. Los ejemplos adecuados de tales cepas serán evidentes para los expertos. Tales cepas y sistemas de producción/ expresión también están disponibles en compañías tales como Biovitrum (Uppsala, Suecia).

Alternativamente, las líneas celulares de mamíferos, en particular las células de ovario de hámster chino (CHO), se pueden usar para la expresión/producción/fermentación en gran escala, y en particular para expresión/producción/fermentación en gran escala de productos farmacéuticos. Además, tales sistemas de expresión/producción también están disponibles en algunas de las compañías mencionadas anteriormente.

La elección del sistema de expresión específico puede depender en parte del requerimiento de determinadas modificaciones pos-traducción, más específicamente la glicosilación. La producción de una proteína recombinante que contiene Nanocuerpo en la que se desea o requiere la glicosilación puede necesitar el uso de huéspedes de expresión mamíferos que tengan la capacidad de glicosilar la proteína expresada. En este aspecto, será evidente para los expertos que el patrón de glicosilación obtenido (es decir la clase, número y posición de los residuos unidos) dependerá de la célula o línea celular que se usa para la expresión. Preferentemente, se usa una célula o línea celular humana (es decir, que produce una proteína que esencialmente tiene un patrón de glicosilación humano) o se usa otra línea celular que puede proporcionar un patrón de glicosilación que es esencial y/o funcionalmente igual al la glicosilación humana o al menos imita la glicosilación humana. Generalmente, los huéspedes procarióticos tales como E. Coli que no tienen la capacidad de glicosilar las proteínas, y el uso de eucariotas inferiores tales como las levaduras usualmente llevan a un patrón de glicosilación que difiere de la glicosilación humana. No obstante, se debe entender que todas las células huésped y sistemas de expresión precedentes se pueden usar en la invención, de acuerdo con el Nanocuerpo o proteína que se desea obtener. En consecuencia, de acuerdo con una realización no limitante de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención está glicosilado. De acuerdo con otra realización no limitante de la invención,

el nanocuerpo o polipéptido de la invención está no glicosilado.

De acuerdo con una realización preferida, pero no limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula bacteriana, en particular una célula bacteriana adecuada para la producción farmacéutica en gran escala, tal como las células de las cepas mencionadas anteriormente.

5 De acuerdo con otra realización preferida, pero no limitante de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula de levadura, en particular una célula de levadura adecuada para la producción farmacéutica en gran escala, tal como las células de las especies mencionadas anteriormente.

10 De acuerdo con aún otra realización preferida, pero no limitante de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula de mamífero, en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana, y más en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana que es adecuada para la producción farmacéutica en gran escala, tal como las líneas celulares mencionadas anteriormente en la presente.

15 Cuando se usa la expresión en una célula huésped para producir los Nanocuerpos y las proteínas de la invención, los Nanocuerpos y proteínas de la invención se pueden producir en forma celular (por ejemplo en el citosol, en el periplasma o en los cuerpos de inclusión) y posteriormente se aíslan de las células huésped y opcionalmente se purifican adicionalmente; o se pueden producir en forma extracelular (por ejemplo, en el medio en que las células huésped se cultivan) y posteriormente se aíslan del medio de cultivo y opcionalmente también se purifican. Cuando se usan las células huésped eucarióticas, usualmente se prefiere la producción extracelular ya que esto facilita considerablemente el aislamiento adicional y el procesamiento posterior de los Nanocuerpos y proteínas obtenidos. Las células bacterianas tales como las cepas de *E. coli* mencionadas anteriormente normalmente no secretan proteínas en forma extracelular, excepto por unas pocas clases de proteínas tales como toxinas y hemolisina, y la producción secretora en *E. coli* se refiere a la translocación de proteínas a través de la membrana interna en el espacio periplásmico. La producción periplásmica proporciona varias ventajas respecto de la producción citosólica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos N-terminal del producto secretado puede ser idéntica a la del producto génico natural después de la escisión de la secuencia señal de secreción por una peptidasa de señal específica. Asimismo, parece haber mucha menos actividad de proteasa en el periplasma que en el citoplasma. Además, la purificación de la proteína es más simple debido a menos proteínas contaminantes en el periplasma. Otra ventaja es que se pueden formar enlaces disulfuros correctos debido a que el periplasma proporciona un ambiente más oxidativo que el citoplasma. Las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* se hallan a menudo en los agregados insolubles, llamados cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión se pueden localizar en el citosol o en el periplasma, la recuperación de las proteínas biológicamente activas de estos cuerpos de inclusión requiere un proceso de desnaturalización/replegado. Muchas proteínas recombinantes, que incluyen proteínas terapéuticas, se recuperan a partir de cuerpos de inclusión. Alternativamente, como será evidente para los expertos, se pueden usar cepas recombinantes de las bacterias que se han modificado genéticamente para secretar una proteína deseada proteína, y en particular un Nanocuerpo o a polipéptido de la invención.

40 En consecuencia, de acuerdo con una realización no limitante de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención es un Nanocuerpo o polipéptido que se ha producido en forma intracelular y que se ha aislado de la célula huésped, y en particular de una célula bacteriana o de un cuerpo de inclusión en una célula bacteriana. De acuerdo con otra realización no limitante de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención es un Nanocuerpo o polipéptido que se ha producido en forma extracelular y que se ha aislado del medio en que se cultiva la célula huésped.

Algunos promotores preferidos, pero no limitantes para usar en estas células huésped incluyen,

45 - para la expresión en *E. coli*: promotor lac (y sus derivados tal como el promotor lacUV5); promotor de arabinosa, promotor de fago lambda izquierdo (PL) y derecho (PR); promotor del operón trp; promotores lac/trp híbridos (tac y tic); promotor T7 (más específicamente que el del gen 10 del fago T7) y otros promotores del fago T; promotor del gen de resistencia de tetraciclina Tn10; variantes manipuladas genéticamente de los promotores anteriores que incluyen una o más copias de una secuencia del operador regulatorio extraño;

50 - para la expresión en *S. cerevisiae*: constitutivo: ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), ENO (enolasa), CYC1 (citocromo c iso-1), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); PGK1 (fosfoglicerato quinasa), PYK1 (piruvato quinasa); regulado: GAL1,10,7 (enzimas de galactosa metabólica), ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2), PHO5 (fosfatasa ácida), CUP1 (metalotioneína de cobre); heterólogo: CaMV (promotor del virus de mosaico de coliflor 35S);

- para la expresión en *Pichia pastoris*: el promotor AOX1 promotor (alcohol oxidasa I)

55 - para la expresión en células mamíferas: potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humana (hCMV); variante del promotor temperano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV) que contiene dos secuencias operadoras de tetraciclina de modo que el promotor se puede regular con el represor Tet, promotor de timidina quinasa del virus Herpes Simplex (TK); potenciador/promotor de la repetición terminal larga del virus de sarcoma Rous (RSV LTR); promotor del factor de elongación α (hEF -1 α) de humano, chimpancé, ratón o rata; el promotor temprano de SV40; promotor de la repetición terminaria larga VIH-1; promotor de β -actina;

Algunos vectores preferidos, pero no limitantes para usar con estas células huésped incluyen:

- vectores para la expresión en células de mamífero: pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-I (8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC37199), pRSVneo (ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565), así como sistemas de expresión basados en virus, tal como los basados en adenovirus;
- vectores para la expresión en células bacterianas: vectores pET (Novagen) y vectores pQE (Qiagen);
- vectores para la expresión en células de levaduras o fúngicas: pYES2 (Invitrogen) y vectores de expresión de Pichia (Invitrogen);
- vectores para la expresión en células de insectos: pBlueBacII (Invitrogen) y otros vectores de baculovirus
- vectores para la expresión en plantas o células de plantas: por ejemplo vectores basados en virus del mosaico de coliflor o virus del mosaico de tabaco, cepas adecuadas de Agrobacterium, o vectores basados en plásmido Ti.

Algunas secuencias secretoras preferidas, pero no limitantes para usar con estas células huésped incluyen:

- para usar en células bacterianas tales como E. coli: PelB, Bla, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, StII, PhoA, PhoE, MalE, Lpp, LamB y similares; péptido señal TAT, señal de secreción C-terminal de hemolisina
- para usar en levaduras: prepro-secuencia del factor de α -apareamiento, fosfatasa (pho1), invertasa (Suc), etc.;
- para usar en células mamíferas: señal indígena en el caso de proteína blanco es de origen eucariótico, péptido señal de la cadena κ de IG de V-12-C; etc.

Las técnicas adecuadas para transformar un huésped o célula huésped de la invención serán evidentes para los expertos y pueden depender de la célula huésped/organismo huésped deseados y el constructo genético usado. También se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionadas anteriormente.

Después de la transformación, se puede realizar una etapa para detectar y seleccionar las células huésped u organismos huésped que se han transformado con éxito con la secuencia de nucleótidos/constructo genético de la invención. Por ejemplo, esto puede ser una etapa de selección basada en un marcador seleccionable en el constructo genético de la invención o una etapa que involucra la detección de la secuencia de aminoácidos de la invención, por ejemplo mediante anticuerpos específicos.

La célula huésped transformada (que pueden estar en la forma de una línea celular estable) u organismos huésped (que pueden estar en la forma de una línea o cepa mutante estable) forman los aspectos adicionales de la presente invención.

Preferentemente, estas células huésped u organismos huésped son tales que expresan, o son capaces de expresar (al menos) (por ejemplo en condiciones adecuadas), una secuencia de aminoácidos de la invención (y en el caso de un organismo huésped: en al menos una célula, parte, tejido u órgano de esto). La invención también incluye otras generaciones, progenie y/o descendencia de la célula huésped u organismo huésped de la invención, que por ejemplo se puede obtener por la división celular o por reproducción sexual o asexual.

Para producir/obtener la expresión de las secuencias de aminoácidos de la invención, la célula huésped transformada u organismo huésped transformado generalmente se puede conservar, mantener y/o cultivar en condiciones tales que se exprese/produzca la secuencia de aminoácidos (deseada) de la invención. Las condiciones adecuadas serán evidentes para los expertos y usualmente dependerán de la célula huésped/organismo huésped usada así como en los elementos regulatorios que controlan la expresión de la secuencia de nucleótidos (relevante) de la invención. Además, se hace referencia en los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente en los párrafos de los constructos genéticos de la invención.

Generalmente, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente de alimento adecuado y/o nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada, y opcionalmente la presencia de un factor inductor adecuado o compuesto (por ejemplo cuando las secuencias de nucleótidos de la invención están bajo el control de un promotor inducible); los cuales pueden ser seleccionados por los expertos. Además, en tales condiciones, la secuencias de aminoácidos de la invención se pueden expresar de una manera constitutiva, de una manera transitoria o solo cuando se inducen adecuadamente.

También será evidente para los expertos que la secuencia de aminoácidos de la invención se puede generar (primero) en una forma inmadura (como se mencionó anteriormente), que posteriormente se puede someter a la modificación post-traducción, de acuerdo con la célula huésped/organismo huésped usado. Asimismo, la secuencia de aminoácidos de la invención se puede glicosilar, otra vez de acuerdo con la célula huésped/organismo huésped usado.

La secuencia de aminoácidos de la invención posteriormente se puede aislar de la célula huésped/organismo huésped y/o del medio en que se cultivó dicha célula huésped u organismo huésped mediante aislamiento de proteínas y/o

técnicas de purificación conocidas per se, tal como técnicas de cromatografía (preparativa) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo mediante una secuencia de aminoácidos escindible específica, fusionada con la secuencia de aminoácidos de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir mediante anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos aislada).

5 Generalmente, para el uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención de las invenciones se pueden formular como una preparación farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos adicionales farmacéuticamente activos. Por de ejemplos no limitantes, tal formulación puede estar en forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica, para administración por inhalación, por un parche cutáneo, por un implante, por un supositorio, etc. Tales formas de administración adecuadas – que pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos, de acuerdo con la manera de administración - así como procedimientos y portadores para usar en la preparación de esta, serán evidentes para los expertos, y se describen adicionalmente más adelante en la presente.

15 Generalmente, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden formular y administrar en cualquier manera adecuada per se, para el cual se hace referencia por ejemplo en la técnica previa general citada anteriormente (y en particular al documento WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865 y WO 04/041867) así como en los manuales estándares, tal como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990) o Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21th Edición, Lippincott Williams and Wilkins (2005).

20 Por ejemplo, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden formular y administrar de cualquiera manera conocida per se para los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos convencionales (que incluyen ScFv y diacuerpos) y otras proteínas farmacéuticamente activas. Tales formulaciones y procedimientos para preparar los mismos serán evidentes para los expertos, y por ejemplo incluyen preparaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intra-arterial o intratecal) o administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

25 Las preparaciones para administración parenteral por ejemplo, pueden ser soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que son adecuadas para la infusión o inyección. Los portadores o diluyentes adecuados para tales preparaciones por ejemplo incluyen, sin limitación, agua estéril y tampones acuosos y soluciones tales como solución salina regulada con fosfato fisiológicas, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank; aceites acuosos; glicerol; etanol; glicoles tal como propilenglicol o así como aceites minerales, aceites animales y aceites vegetales, por ejemplo aceite de maní, aceite de soja, así como sus mezclas adecuadas. Usualmente, se preferirán las soluciones o suspensiones acuosas.

30 Los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención también se pueden administrar mediante procedimientos de administración de terapia génica. Ver, por ejemplo, Patente U.S Núm. 5.399.346, que se incorpora por referencia en su totalidad. Mediante un procedimiento de administración de terapia génica, las células primarias transfectadas con el gen que codifica un Nanocuerpo o polipéptido de la invención se pueden transfectar adicionalmente con promotores específicos de tejido en órganos, tejido, injertos, tumores, o células específicas blanco y adicionalmente se pueden transfectar con secuencias señal y de estabilización para la expresión localizada en forma subcelular.

35 En consecuencia, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo, vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Estos se pueden encapsular en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporan directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden combinar con uno o más excipientes y usados en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones se deben contener al menos 0,1% del nanocuerpo o polipéptido de la invención. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, obviamente, se puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 60% del peso de una forma de dosis unitaria dada. La cantidad del nanocuerpo o polipéptido de la invención en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosis efectivo.

40 Los comprimidos, pastillas, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener los siguientes: aglutinantes tales como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspártamo o un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria, o cereza. Cuando la forma de dosis unitaria es una cápsula, puede contener además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros diversos materiales pueden estar presentes como cubiertas o modificar de otro modo la forma física de la forma de dosis unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, pastillas, o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como sabor de cereza o naranja. Obviamente, cualquier material usado para preparar cualquier forma de dosis unitaria debe

ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

5 Las preparaciones y formulaciones para administración oral también se pueden proporcionar con una cubierta entérica que permitirá que los constructos de la invención resistan el ambiente gástrico y pasen en los intestinos. Más generalmente, las preparaciones y formulaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para la administración de cualquier parte deseada del aparato gastrointestinal. Además, se pueden usar supositorios adecuados para la administración en el aparato gastrointestinal.

10 Los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención también se pueden administrar por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección. Las soluciones de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcla con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y sus mezclas y en aceites. En las condiciones de conservación y uso ordinarias, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

15 Las formas de dosis farmacéuticas adecuadas para la inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que se adaptan para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables o infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la última forma de dosis debe ser estériles, fluidas y estables e las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un solvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y a similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y sus mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede producir por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir por el uso de las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20

25

30 Las soluciones inyectables estériles se preparan por la incorporación de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización con filtro. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilizado, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente activo adicional presente en las soluciones filtradas en forma estéril previamente.

Para la administración tópica, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden aplicar en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, en general será conveniente administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser sólido o líquido.

35 Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxiaquilos o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en que los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden disolver o dispersar en niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Los adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales se pueden añadir para optimizar las propiedades para un uso determinado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar en parches absorbentes, usados para impregnar vendas y otros apósitos o rociar sobre el área afectada mediante el uso de rociadores tipo bomba o aerosol.

40

También se pueden emplear espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácido graso, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con portadores líquidos para formar pastas untables, geles, ungüentos, jabones y similares, para la aplicación directa en la piel del usuario.

45 Los ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que se pueden usar para administrar los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención en la piel son conocidas en la técnica; por ejemplo, ver Jacquet et al. (Patente U.S. Núm. 4.608.392), Geria (Patente U.S. Núm. 4.992.478), Smith et al. (Patente U.S. Núm. 4.559.157) y Wortzman (Patente U.S. Núm. 4.820.508).

50 Las dosis útiles de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden determinar por la comparación de su actividad in vitro, y actividad in vivo en los modelos animales. Los procedimientos para la extrapolación de dosis efectivas en ratones, y otros, a seres humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, ver Patente U.S. Núm. 4.938.949.

55 Generalmente, la concentración de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente 0,1-25% en peso, preferentemente de aproximadamente 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será aproximadamente 0,1-5% en peso, preferentemente aproximadamente 0,5-2,5% en peso.

La cantidad de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención necesarios para usar en el tratamiento variará no solo

con el Nanocuerpo o polipéptido particular seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección tratada y la edad y la afección del paciente y por último a criterio del médico o clínico asistente. Asimismo la dosis de los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención varía de acuerdo con la célula, tumor, tejido, injerto u órgano blanco.

5 La dosis deseada se puede presentar de modo conveniente en una dosis única o como dosis divididas administradas en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más sub-dosis por día. La sub-dosis misma también se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en numerosas administraciones diferenciadas espaciadas libremente; tal como inhalaciones múltiples de un insuflador o por aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

10 Un régimen de administración puede incluir tratamiento diario a largo plazo. Por "largo plazo" se entiende al menos dos semanas y preferentemente, varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este rango deseado pueden ser determinadas por los expertos en la técnica mediante solo experimentación de rutina dadas las enseñanzas de la presente. Ver Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosis también puede ser ajustada por el médico en forma individual en el caso de alguna complicación.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno relacionado a TNF como se menciona en la presente, dicho procedimiento que comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

20 En el contexto de la presente invención, el término "prevención y/o tratamiento" no solo comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, pero también generalmente comprende prevenir el inicio de la enfermedad, lentificar o revertir el progreso de la enfermedad, prevenir o lentificar el inicio 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 cualquiera de los síntomas asociados con la misma y/o prevenir un aumento adicional de la gravedad de la enfermedad y/o de cualquiera de los síntomas asociados con la misma, prevenir, reducir o revertir cualquier daño fisiológico causado por la enfermedad, y generalmente cualquier acción farmacológica que es beneficioso para el paciente tratado.

25 El sujeto para tratar puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero en particular es un mamífero, y más en particular un ser humano. Como será evidente para los expertos, el sujeto para tratar en particular será una persona que sufre de, o en riesgo de, las enfermedades y trastornos mencionados en la presente.

30 La invención también se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que se puede prevenir y/o tratar por la administración de un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a un paciente, dicho procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

35 Más en particular, la invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno elegido del grupo que consiste en las enfermedades y trastornos listados en la presente, dicho procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

40 En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para inmunoterapia, y en particular para la inmunoterapia pasiva, tal procedimiento comprende administrar a un sujeto que sufre de o está en riesgo de las enfermedades y trastornos mencionados en la presente, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

45 En los anteriores procedimientos, los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprende los mismos se pueden administrar de cualquier manera, de acuerdo con la formulación o composición farmacéutica específica usada. En consecuencia, los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprende los mismos por ejemplo se pueden administrar por vía oral, intraperitoneal (por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular, o por medio de cualquier otra vía de administración que elude el aparato gastrointestinal), intranasal, transdérmico, tópico, por medio de un supositorio, por inhalación, de nuevo de acuerdo con la formulación o composición farmacéutica específica que se usa. El médico podrá seleccionar una vía de administración adecuada y una formulación o composición farmacéutica adecuada para usar en tal administración, de acuerdo con la enfermedad o trastorno por prevenir o tratar y otros factores bien conocidos en la clínica.

55 Los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprende los mismos se administran de acuerdo con un régimen de tratamiento que es adecuada para prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno por prevenir o tratar. El clínico generalmente podrá determinar un régimen de tratamiento adecuado, de acuerdo con los factores tal como la enfermedad o trastorno por prevenir o tratar, la gravedad de la enfermedad por tratar y/o la gravedad de sus síntomas, el Nanocuerpo o polipéptido específico de la invención que se usa, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica usada, la edad, género, peso, dieta, condición general del paciente, y factores similares bien conocidos por el clínico.

Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de uno o más Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención, o de uno o más composiciones que comprende los mismos, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente efectivas. Las cantidades o dosis específicas para administrar pueden ser determinadas por el médico clínico, nuevamente sobre la base de los factores mencionados anteriormente.

5 Generalmente, para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en la presente y de acuerdo con la enfermedad o trastorno específico por tratar, la potencia del Nanocuerpo y polipéptido específico de la invención usado, la vía específica de administración y la formulación o composición farmacéutica específica usada, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención generalmente se administrarán en una cantidad entre 1 gramo y 0,01 microgramo por kilo de peso corporal por día, preferentemente entre 0,1 gramo y 0,1 microgramo por kg de peso corporal por día, tal como aproximadamente 1, 10, 100 o 1000 microgramos por kg de peso corporal por día, continuamente (por ejemplo, por infusión), como una dosis diaria única o como múltiples dosis divididas durante el día. El médico clínico generalmente podrá determinar una dosis diaria adecuada, de acuerdo con los factores mencionados en la presente. También será evidente que en los casos específicos, el clínico puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo sobre la base de los factores citados anteriormente y criterio experto. Generalmente, se puede obtener alguna pauta sobre las cantidades para administrar de las cantidades usualmente administradas para los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos convencionales comparables contra el mismo blanco administrado por medio de esencialmente la misma vía, tomando en cuenta sin embargo, las diferencias en afinidad (avidéz, eficacia, biodistribución, vida media y factores similares bien conocidos por los expertos.

Usualmente, en el procedimiento anterior, se usará un Nanocuerpo o polipéptido de la invención único. 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 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 producir un efecto sinérgico. Además, el clínico podrán seleccionar estos compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, sobre la base de los factores citados anteriormente y su criterio experto.

En particular, los Nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden usar en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos que son o se pueden usar para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en la presente, como resultado del cual se puede obtener o no un efecto sinérgica. Los ejemplos de tales compuestos y principios, así como vías, procedimientos y formulaciones o composiciones farmacéuticas para administrarlos serán evidentes para el clínico.

Cuando dos o más sustancias o principios se usan como parte de un régimen de tratamiento combinado, ellos se pueden administrar por medio de la misma vía de administración o por medio de diferentes vías de administración, en esencialmente el mismo tiempo o a diferentes tiempos (por ejemplo esencialmente en forma simultánea, consecutiva, o de acuerdo con un régimen alternativo). Cuando las sustancias o principios se administran en forma simultánea por medio de la misma vía de administración, se pueden administrar como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, como será evidente para los expertos.

Asimismo, cuando se usan dos o más sustancias o principios activos: como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios se pueden administrar en la misma cantidad y de acuerdo con el mismo régimen que se usa cuando el compuesto o principio se usa por sí mismo, y tal uso combinado puede o no producir un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de dos o más sustancias o principios activos produce un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de uno, más o todas las sustancias o principios por administrar, mientras que aún se obtiene la acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil por ejemplo, para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario que se asocian con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando ellos se usan en sus cantidades usuales, mientras que aún se obtiene el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

La efectividad del régimen de tratamiento usado de acuerdo con la invención se puede determinar y/o seguir de cualquiera manera conocida per se para la enfermedad o trastorno involucrado, como será evidente para el clínico. El clínico también podrá, cuando sea apropiado y o sobre la base caso por caso, para cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, de modo de obtener el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados y/o alcanzar un equilibrio apropiado entre lograr el efecto terapéutico deseado por una parte y evitar, limitar o reducir efectos secundarios no deseados por otra parte.

Generalmente, el régimen de tratamiento seguirá hasta obtener el efecto terapéutico deseado y/o durante todo el tiempo en que se mantiene el efecto terapéutico deseado. Además, esto puede ser determinado por el clínico, en consecuencia, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un Nanocuerpo de la invención o al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador adecuado (es decir un portador adecuado para uso veterinario), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

La invención también se refiere al uso de un Nanocuerpo de la invención y/o de un polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica, en particular en la preparación de una composición farmacéutica para la

prevención y/o tratamiento (que incluye pero sin limitación al alivio de al menos un síntoma) de una enfermedad o trastorno mediado por TNF-alfa y/o asociado con TNF-alfa (por ejemplo, asociado con una actividad anormal de TNF-alfa, niveles anormales de TNF-alfa, expresión anormal de TNF-alfa y/o sensibilidad anormal o respuesta a TNF-alfa) o de uno de los fenómenos biológicos asociados con TNF-alfa tal como una de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente.

La invención también se refiere a un procedimiento para prevenir y/o tratar (que incluye pero sin limitación al alivio de al menos un síntoma) de una enfermedad o trastorno mediada por TNF-alfa y/o asociado con TNF-alfa (por ejemplo asociado con actividad anormal de TNF-alfa, niveles anormales de TNF-alfa, expresión anormal de TNF-alfa y/o sensibilidad o respuesta anormal a TNF-alfa, o de uno de los fenómenos biológicos asociados con TNF-alfa), tal como una de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente, tal procedimiento comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente activa de un Nanocuerpo de la invención, de polipéptido de la invención, y/o de a composición farmacéutica como se describió anteriormente.

La presente invención proporciona polipéptidos que comprende uno o más nanocuerpos se dirige hacia factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). La presente invención también se refiere a su uso y diagnóstico y terapia. Tales anticuerpos pueden tener una secuencia estructural con alta homología con las secuencias estructurales humanas. Se describen composiciones que comprenden anticuerpos para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) solo o en combinación con otros fármacos.

Se considera que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) cumple un papel importante en varios trastornos, por ejemplo, en trastornos inflamatorios tal como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y esclerosis múltiple. Tanto TNF-alfa como los receptores (CD120a, CD120b) se han estudiado en gran detalle. La TNF-alfa en su forma bioactiva es un trímero y el surco formado por las subunidades vecinas es importante para la interacción de la citoquina-receptor. Se han desarrollado varias estrategias para antagonizar la acción de la citoquina y se usan actualmente para tratar los estados de enfermedad.

Un inhibidor de TNF-alfa que tiene suficiente especificidad y selectividad para TNF-alfa puede ser un compuesto farmacéutico profiláctico o terapéutico eficiente para prevenir o tratar trastornos en que los se ha implicado el TNF-alfa como agente causante. Se han descrito los procedimientos de tratar el shock tóxico (EP 486526), regresión del tumor, inhibición de citotoxicidad (US 6448380, US 6451983, US 6498237), enfermedad autoinmune tal como RA y enfermedad de Crohn (EP 663836, US 5672347, US 5656272), reacción de injerto versus huésped (US 5672347), meningitis bacteriana (EP 585705) por medio de un anticuerpo al TNF-alfa.

Sin embargo ninguno de los fármacos disponibles actualmente son completamente efectivos para el tratamiento de la enfermedad autoinmune, y la mayor parte están limitados por toxicidad severa. Además, es extremadamente difícil y un proceso prolongado desarrollar una nueva entidad química (NCE) con suficiente potencia y selectividad para tal secuencia blanco. Por otra parte los agentes terapéuticos basados en el anticuerpo tienen significativo potencial como fármacos debido a que tienen especificidad exquisita por su blanco y una baja toxicidad intrínseca. Además, el tiempo de desarrollo se puede reducir en forma considerable cuando se compararon con el desarrollo de nuevas entidades químicas (NCE). Sin embargo, los anticuerpos convencionales son difíciles de originar contra proteínas multiméricas donde el receptor-dominio de unión del ligando está incrustado en un surco, como es en el caso con TNF-alfa. Los anticuerpos de cadena pesada descritos en la invención que se derivan de los camélidos, son conocidos por tener propiedades de unión en la cavidad (W097/49805; Lauwereys et al, EMBO J. 17, 5312, 1998)). En consecuencia, tales anticuerpos de cadena pesada son inherentemente adecuados para unirse a los dominios de unión del receptor de tales ligandos como TNF. Además, se sabe que tales anticuerpos son estables durante períodos de tiempo más largos, en consecuencia aumenta su vida media (Perez et al, Biochemistry, 40, 74, 2001). Por otra parte, tales fragmentos del anticuerpo de cadena pesada se pueden producir "en masa" en fermentadores mediante sistemas de expresión económicos en comparación con la fermentación de cultivo de las células mamíferas, tal como levaduras u otros microorganismos (EP 0 698 097).

El uso de anticuerpos derivados de fuentes tales como ratón, oveja, cabra, conejo, etc., y sus derivados humanizados como un tratamiento para las afecciones que requieren una modulación de inflamación es problemático por varias razones. Los anticuerpos tradicionales no son estables a temperatura ambiente, y se deben refrigerar para la preparación y el almacenamiento, lo que requiere el equipamiento de laboratorio, almacenamiento y transporte refrigerado necesario, lo que contribuye al tiempo y gasto. La refrigeración algunas veces no es factible en los países en desarrollo. Además, la fabricación o producción en pequeña escala de dichos anticuerpos es costosa porque los sistemas celulares de mamífero necesarios para la expresión de anticuerpos intactos y activos requieren altos niveles de soporte en términos de tiempo y equipo, y los rendimientos son muy bajos. Por otra parte el tamaño grande de los anticuerpos convencionales, puede restringir la penetración del tejido, por ejemplo, en el sitio del tejido inflamado. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende del pH, y en consecuencia son inadecuados para usar en ambientes fuera del rango de pH fisiológico usual tal como, por ejemplo, para tratar el sangrado gástrico, cirugía gástrica. Además, los anticuerpos tradicionales son inestables a pH bajo o alto y en consecuencia no son adecuados para administración oral. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos de camélidos resisten condiciones duras, tales como pH extremo, reactivos desnaturalizantes y altas temperaturas (Dumoulin et al, Protein Science I I, 500, 2002), de este modo los hace adecuados para la administración por administración oral. Por otra parte, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión, que depende de la

temperatura, y en consecuencia no son adecuados para usar en los ensayos o kits realizados a temperaturas fuera de los rangos de temperatura biológicamente activos (por ejemplo $37 \pm 20^\circ\text{C}$).

5 Los agentes terapéuticos polipeptídicos y en particular los agentes terapéuticos basados en anticuerpos tienen potencial significativo como fármacos ya que ellos tienen especificidad exquisita por su blanco y una baja toxicidad intrínseca. Sin embargo, es conocido por los destinatarios expertos que un anticuerpo que ha sido obtenido para un blanco terapéuticamente útil requiere modificación adicional a fin de prepararlo para la terapia humana, de modo de evitar una reacción inmunológica no deseada en un individuo humano después de la administración de este. El proceso de modificación se denomina comúnmente "humanización". Es conocido por los expertos que los anticuerpos originados en especies, diferentes de los seres humanos requieren la humanización para producir el anticuerpo terapéuticamente útil en los seres humanos ((1) CDR grafting Protein Design Labs: US 6180370, US 5693761; Genentech US 6054297; Celltech: 460167, EP 626390, US 5859205; (2) Veneering: Xoma: US 5869619, US 5766886, US 5821123). Se necesita un procedimiento para producir anticuerpos que eviten el requerimiento de humanización sustancial, o que se obvie completamente la necesidad de humanización. Se necesita una nueva clase de anticuerpos que tengan regiones estructurales o residuos de aminoácidos definidos y que se puedan administrar a un sujeto humano sin el requerimiento de humanización sustancial, o la necesidad de humanización en absoluto.

Otro importante inconveniente de los anticuerpos convencionales es que ellos son moléculas grandes y complejas, y en consecuencia son relativamente inestables, y son sensibles a la degradación por proteasas. Esto significa que los fármacos de anticuerpo convencional no se pueden administrar por vía oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, rectal o por inhalación debido a que no son resistentes al pH bajo en estos sitios, la acción de las proteasas en estos sitios y en la sangre y/o debido a su gran tamaño. Estos se deben administrar por inyección (en forma intravenosa, subcutánea, etc.) para superar algunos de estos problemas. La administración por inyección requiere el entrenamiento del especialista para usar una jeringa o aguja hipodérmica en forma correcta y segura. También se requiere equipamiento estéril, una formulación líquida del polipéptido terapéutico, empaquetado del vial de dicho polipéptido de una forma estéril y estable y, del sujeto, un sitio adecuado para la entrada de la aguja. Por otra parte, los sujetos comúnmente experimentan estrés físico y fisiológico antes y después de recibir una inyección. En consecuencia, se necesita un procedimiento para la administración de polipéptidos terapéuticos que evite la necesidad de inyección que es no solo ahorrador de costo/tiempo, pero que también puede ser más conveniente y más cómodo para el sujeto.

Los agentes terapéuticos basados en Nanocuerpos tienen potencial significativo como fármacos ya que tienen especificidad exquisita por su blanco y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, la mejora adicional de su afinidad intrínseca y funcional puede producir muchos beneficios para un paciente tal como reducción de la dosis de agentes terapéuticos, terapia más rápida y reducción defectos secundarios.

Una realización de la presente invención es un Nanocuerpo anti-TNF-alfa, tal nanocuerpo es preferentemente como también se describió anteriormente.

Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende al menos un Nanocuerpo anti-TNF-alfa, tal polipéptido es preferentemente como también se describió anteriormente.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente que además comprende al menos un Nanocuerpo dirigido contra a proteína sérica.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se describió anteriormente en el que dicha proteína sérica es alguna de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina, o fibrinógeno.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente que además comprende al menos un Nanocuerpo seleccionado del grupo que consiste en Nanocuerpo anti-INF-gamma, Nanocuerpo del receptor anti-TNF-alfa y Nanocuerpo del receptor anti-TNF-gamma.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, en el que el número de Nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa es al menos dos.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se describió anteriormente, en el que al menos un Nanocuerpo es un V_{HH} de camélidos humanizado.

Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente y al menos un Nanocuerpo del grupo que consiste en Nanocuerpo anti-INF-gamma, Nanocuerpo del receptor anti-TNF-alfa y Nanocuerpo del receptor anti-TNF-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, o una composición como se describió anteriormente, en que dicho nanocuerpo es una secuencia homóloga, una porción funcional, o una porción funcional de una secuencia homóloga del Nanocuerpo de longitud completa.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, o una

composición como se describió anteriormente, en el que el polipéptido anti-TNF-alfa es una secuencia homóloga, una porción funcional, o una porción funcional de una secuencia homóloga del polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa.

5 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, o una composición como se describió anteriormente en el que al menos un Nanocuerpo es un V_{HH} de camélidos.

Otra realización de la presente invención es un ácido nucleico que codifica un polipéptido anti-TNF-alfa anti- como se describió anteriormente.

10 Otra realización de la presente invención es un procedimiento de identificar un agente que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, al factor de necrosis tumoral alfa que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente con un blanco que es el Factor de necrosis tumoral alfa, en presencia y ausencia de un modulador candidato en condiciones que permiten la unión entre dicho polipéptido y blanco, y

15 (b) medir la unión entre el polipéptido y blanco de la etapa (a), en la que una disminución de la unión en presencia de dicho modulador candidato, con respecto a la unión en ausencia de dicho modulador candidato identificó dicho modulador candidato como un agente que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente y factor de necrosis tumoral alfa.

20 Otra realización de la presente invención es un procedimiento de identificar un agente que modula trastornos mediados por factor de necrosis tumoral alfa a través de la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente al factor de necrosis tumoral alfa que comprende:

(a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente con un blanco que es el factor de necrosis tumoral alfa, en presencia y ausencia de a modulador candidato en condiciones que permiten entre dicho polipéptido y blanco, y

25 (b) medir la unión entre el polipéptido y blanco de la etapa (a), en que una disminución de la unión en presencia de dicho modulador candidato, con respecto a la unión en ausencia de de dicho modulador candidato identificó, dicho modulador candidato como un agente que modula trastornos mediados por factor de necrosis tumoral alfa.

Otra realización de la presente invención es un procedimiento de identificación de un agente que modula los trastornos mediados por factor de necrosis tumoral alfa a su receptor a través de la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente al factor de necrosis tumoral alfa que comprende:

30 (a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente con un blanco que es el factor de necrosis tumoral alfa, en presencia y ausencia de a modulador candidato en condiciones que permiten la unión entre dicho polipéptido y blanco, y

35 (b) medir la unión entre el polipéptido y blanco de la etapa (a), en que una disminución de la unión en presencia de dicho modulador candidato, con respecto a la unión en ausencia de dicho modulador candidato identificó dicho modulador candidato como un agente que modula la unión de factor de necrosis tumoral alfa a su receptor.

Otra realización de la presente invención es un kit para detectar agentes que modulan trastornos mediados por factor de necrosis tumoral alfa que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente y factor de necrosis tumoral alfa.

40 Otra realización de la presente invención es un agente desconocido que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente al factor de necrosis tumoral alfa, identificado de acuerdo con el procedimiento como se describió anteriormente.

Otra realización de la presente invención es un agente desconocido que modula trastornos mediados por factor de necrosis tumoral alfa, identificado de acuerdo con los procedimientos que se describieron anteriormente.

45 Otra realización de la presente invención es un agente desconocido como se describió anteriormente en que dichos trastornos son uno o más de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio y esclerosis múltiple.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti TNF-alfa que se describió anteriormente, o un ácido nucleico como se describió anteriormente, o una composición como se describió anteriormente, o un agente como se describió anteriormente para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con los procesos inflamatorios.

50 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o a ácido nucleico como se describió anteriormente, o una composición que se describió anteriormente, o un agente como se describió anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos

relacionados con las reacciones inflamatorias.

5 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptible para la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el ambiente gástrico sin que se inactive la sustancia.

Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el ambiente gástrico sin que se inactive la sustancia.

10 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

15 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón.

20 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón.

25 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

30 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

35 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua en forma efectiva.

Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua en forma efectiva.

40 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel en forma efectiva.

45 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente o una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel en forma efectiva.

50 Otra realización de la presente invención es un procedimiento como se describió anteriormente, un kit como se describió anteriormente, un ácido nucleico o agente como se describió anteriormente, uso de un ácido nucleico o agente como se describió anteriormente, a composición como se describió anteriormente, use de a composición como se describió anteriormente, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, use de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente en el que dichos trastornos son cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, Diabetes Tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, Lupus eritematoso sistémico, Infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis,

55

escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, y vasculitis.

Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un ácido nucleico o agente como se describió anteriormente, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, o una composición como se describió anteriormente, y un vehículo farmacéutico adecuado.

5 Otra realización de la presente invención es un procedimiento de diagnosticar un trastorno caracterizado por la disfunción del factor de necrosis tumoral alfa que comprende:

(a) poner en contacto una muestra con un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente,

(b) detectar la unión de dicho polipéptido a dicha muestra, y

10 (c) comparar la unión detectada de la etapa (b) con un estándar, en que una diferencia en la unión con respecto a dicha muestra es diagnóstico de un trastorno caracterizado por la disfunción del factor de necrosis tumoral alfa.

Otra realización de la presente invención es un kit para detectar un trastorno mencionado anteriormente, mediante un procedimiento como se describió anteriormente.

Otra realización de la presente invención es un kit para detectar un trastorno mencionado anteriormente que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa aislado como se describió anteriormente.

15 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente para la purificación de dicho factor de necrosis tumoral alfa.

Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente para inhibir la interacción entre el factor de necrosis tumoral alfa y uno o más receptores del factor de necrosis tumoral alfa.

20 Otra realización de la presente invención es un procedimiento para producir un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente que comprende las etapas de

(a) obtener ADN de cadena doble que codifica un V_{HH} de camélidos dirigido al factor de necrosis tumoral alfa,

(b) clonar y expresar el ADN seleccionado en la etapa (a).

25 Otra realización de la presente invención es un procedimiento de producir un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente que comprende:

(a) cultivar las células huésped que comprende ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente, en condiciones que permiten la expresión del polipéptido, y,

(b) recuperar el polipéptido producido del cultivo.

30 Otra realización de la presente invención es un procedimiento como se describió anteriormente, en que dichas células huésped son bacterianas o de levadura.

Otra realización de la presente invención es un kit para detectar alguna de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio o esclerosis múltiple que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa como se describió anteriormente.

35 V_{HH} , de acuerdo con la presente invención, y como es conocido por los destinatarios expertos son dominios variables de cadena pesada derivados de inmunoglobulinas desprovistas naturalmente de las cadenas livianas tales como las derivadas de los Camelidae como se describe en el documento WO 94/04678 (y denominada de aquí en adelante en la presente como dominios V_{HH} o nanocuerpos). Las moléculas de V_{HH} aproximadamente 10x más pequeñas que las moléculas de IgG. Ellos son polipéptidos simples y muy estables, que resisten condiciones extremas de pH y/o temperatura. Además, son resistentes a la acción de las proteasas, lo que no es el caso para los anticuerpos convencionales. Además, la expresión in vitro de los V_{HH} produce alto rendimiento de V_{HH} funcionales plegados apropiadamente. Además, los anticuerpos generados en los camélidos reconocerán epitopes diferentes de los reconocidos por los anticuerpos generados in vitro mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos o por medio de la inmunización de mamíferos diferentes de los camélidos (WO 9749805). Como tal, los V_{HH} anti-TNF-alfa pueden interactuar más eficientemente con TNF-alfa que los anticuerpos convencionales, de este modo bloquean su interacción

40 con el receptor de TNF-alfa de modo más eficiente.

45 TNF-alfa también es el fragmento de TNF-alfa, capaz de inducir una respuesta inmunológica. TNF-alfa también es un fragmento de TNF-alfa, capaz de unirse a un Nanocuerpo originado contra el TNF-alfa de longitud completa.

Un Nanocuerpo dirigido contra TNF-alfa significa el nanocuerpo que es capaz de unirse a TNF-alfa con una afinidad mejor que $10^{-6}M$.

El uno o más nanocuerpos del polipéptido anti-TNF que se dirigen contra un TNF-alfa pueden ser de la misma secuencia. Alternativamente ellos pueden no tener la misma secuencia. Está dentro del alcance de la invención que un polipéptido anti-TNF comprenda nanocuerpos anti-TNF-alfa que no comparten la misma secuencia, pero que se dirigen contra el mismo blanco, uno o más antígenos de estos.

5 La presente invención también se refiere a un polipéptido anti-TNF alfa descrito y reivindicado en la presente, en el dicho nanocuerpo es un V_{HH} dirigido contra TNF-alfa, en el que el V_{HH} pertenece a una clase que tiene secuencias tipo humanas. La clase se caracteriza porque los V_{HH} portan un aminoácido del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina, serina, treonina, asparagina, o glutamina en la posición 45, tal como, por ejemplo, L45 y un triptofano en la posición 103, de acuerdo con la numeración de Kabat.

10 Otra clase de tipo humana de los nanocuerpos de camélidos se ha descrito en el documento WO03035694 y contienen los residuos hidrófobos FR2 que se hallan normalmente en los anticuerpos convencionales de origen humano o de otra especie, pero que compensa esta pérdida de hidrofobicidad con el residuo de arginina cargado de la posición 103 que sustituye el residuo de triptofano conservado presente en el VH de los anticuerpos de cadena doble. Como tal, los péptidos pertenecientes a las dos clases muestran una alta homología de secuencia de aminoácidos con las regiones

15 estructurales del VH humano y dichos péptidos se podrían administrar a un ser humano en forma directa sin expectativas de una respuesta inmunitaria no deseada a partir de los mismos, y sin la cara de la humanización posterior. La invención también se refiere a los ácidos nucleicos capaces de codificar dichos polipéptidos.

20 Cualquiera de las V_{HH} que se usaron en la invención puede ser de la clase tradicional o de las clases de anticuerpos de camélidos tipo humano. Dichos anticuerpos se pueden dirigir contra TNF-alfa completo o un fragmento de este, o un fragmento de una secuencia homóloga del mismo. Estos polipéptidos incluyen los anticuerpos de camélidos de longitud completa, a saber dominios de Fc y V_{HH} , versiones de los anticuerpos de camélidos de cadena completa con un con un dominio de Fc o V_{HH} humano por sí mismos o fragmentos derivados.

25 Los V_{HH} anti-albúmina sérica pueden interactuar de una manera más eficiente con albúmina sérica que los anticuerpos convencionales que es conocida por ser una proteína portadora. Como proteína portadora, algunos de los epitopes de la albúmina sérica pueden ser inaccesibles para las proteínas unidas, péptidos y compuestos químicos pequeños. Debido a que se sabe que los V_{HH} se unen a los epitopes "inusuales" o no convencionales tales como cavidades (documento WO 97149805), se puede aumentar la afinidad de tales V_{HH} en la albúmina circulante.

30 La presente invención también se refiere al hallazgo de que un polipéptido anti-TNF que se describe en la presente que además comprende uno o más Nanocuerpos dirigidos contra una o más proteína séricas de un sujeto, de modo sorprendente presenta una vida media significativamente prolongada en la circulación de dicho sujeto en comparación la vida media del Nanocuerpo anti-TNF-alfa cuando no parte de dicho constructo. Por otra parte, se halló que los dichos polipéptidos exhiben las mismas propiedades favorables de los nanocuerpos tales como alta estabilidad que continúa intacta en los ratones, resistencia de pH extremo, estabilidad a temperatura alta y alta afinidad por el blanco.

35 La proteína sérica puede ser cualquier proteína adecuada hallada en el suero del sujeto. En aspecto de la invención, la proteína sérica es albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. De acuerdo con el uso deseado tal como la vida media requerida para el tratamiento efectivo y/o compartimentalización del antígeno blanco, el compañero de V_{HH} se puede dirigir a una de las anteriores proteínas séricas.

40 De acuerdo con un aspecto específico, pero no limitante de la invención, el nanocuerpo contra albúmina sérica humana consiste en 4 regiones estructurales (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 5 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en que:

(iv) CDR1 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

SFGMS [SEQ ID NO: 361

LNLMG (SEQ ID NO: 371

INLLG [SEQ ID NO: 38]

45 NYWMY; (SEQ ID NO: 391

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

50 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

y en que:

(v) CDR2 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en

SISGSGSDTLYADSVKG	[SEQ ID NO: 40]
TITVGDSTNYADSVKG	[SEQ ID NO: 41]
TITVGDSTSYADSVKG	[SEQ ID NO: 42]
SINGRGDDTRYADSVKG	[SEQ ID NO: 43]
AISADSSTKNYADSVKG	[SEQ ID NO: 44]
AISADSSDKRYADSVKG	[SEQ ID NO: 45]
RISTGGGYSYYADSVKG	[SEQ ID NO: 46]

O del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las anteriores secuencias de aminoácidos; en que

5 (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

15 y en que:

(vi) CDR3 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

DREAQVDTLDFDY [SEQ ID NO: 47]

20 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con una de las anteriores secuencias de aminoácidos; en que

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

30 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

o del grupo que consiste en:

GGSLSR [SEQ ID NO: 48]

RRTWHSEL (SEQ ID NO: 49)

GRSVSRS [SEQ ID NO: 50]

35 GRGSP (SEQ ID NO: 51)

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

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a un Nanocuerpo contra albúmina sérica humana, que consiste en 4 regiones estructurales (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), que se elige del grupo que consiste en anticuerpos del dominio y/o anticuerpos de dominio único con una de las siguientes combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente:

CDR1: SFGMS; CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG; CDR3: GGSLSR;

CDR1: LNLMG; CDR2: TITVGDSTNYADSVKG; CDR3: RRTWHSEL;

CDR1: INLLG; CDR2: TITVGDSTSYADSVKG; CDR3: RRTWHSEL;

CDR1: SFGMS; CDR2: SINGRGDDTRYADSVKG; CDR3: GRSVSRS;

CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3: GRGSP;

CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3: GRGSP;

CDR1: NYWMY; CDR2: RISTGGGYSYADSVKG; CDR3:

DREAQVDTLDFDY.

- 10 En los Nanocuerpos de la invención que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas anteriormente, cada CDR se puede reemplazar con una CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 80%, preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aun más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (como se define en la presente) con las mencionadas CDR; en que

15 (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos;

- 20 y/o elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 (como se indica en el párrafo precedente) "diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) con las mencionadas CDR una de las anteriores secuencias de aminoácidos, en que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente a sustitución conservadora de aminoácido (como se define en la presente); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácido, y sin inserciones o supresiones de aminoácido, en comparación con las anteriores secuencias de aminoácidos.

- 25 Sin embargo, de los Nanocuerpos de la invención que comprenden las combinaciones de CDR mencionados anteriormente, los Nanocuerpos que comprenden uno o más de las CDR enumeradas anteriormente son particularmente preferidos; los Nanocuerpos que comprenden dos o más de las CDR enumeradas anteriormente son más particularmente preferido; y Nanocuerpos que comprende tres de las CDR enumeradas anteriormente son los más particularmente preferido.

- 30 En estos Nanocuerpos contra albúmina sérica humana, las regiones estructurales FR1 a FR4 son preferentemente como se definieron anteriormente en la presente para los Nanocuerpos de la invención.

Los Nanocuerpos particularmente preferidos contra albúmina sérica humana se eligen del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 61 a 67, SEQ ID NOs 87 a 89 y SEQ ID NOs 100-104, Las combinaciones preferidas de CDR y las regiones estructurales presentes en estos Nanocuerpos también se enumeran en la Tabla II

35

Tabla II: Combinación preferida de secuencias estructurales y CDR en los Nanocuerpos contra albúmina sérica humana.

Clon	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
PMP6A8 (ALB2)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	6	7			WYRQPGN		TCITVGDSTNYA			RFTISMDYTKOTVYLHMN				WGQGTQV
	8	5	LNLMG		ERELVA		DSVKG			SLRPEDTGLYYCKI		RRTWHSSEL		TVSS
PMP6B4	3	3			WYRQPGN		TITVGDSTSYAD			RFTISRQYDKNTLYLOMN		RRTWHSSEL		WGQGTQV
	6	7			ERELVA		SVKG			SLRPEDTGLYYCKI				TVSS
PMP6A6 (ALB1)	3	3			WVROAPGK		SISGSGSDTLYA			RFTISRDNNAKNTLYLOMN				SSQGTQV
	7	7			EPEWVS		DSVKG			SLKPEDTAVYYCTI		GGSLSR		TVSS
	0	7	SFGMS				SINGRGDDIRYA			RFSISRDNNAKNTLYLOMN		GRSVRSR		RTQGTQV
PMP6C1	3	3			WVROAPGK		DSVKG			SLKPEDTAEYYCTI				TVSS
	7	8			EPEWVS		DSVKG			RFTISRDNNAKNTLYLOMN				SSPGTQV
	1	8	SFGMS		DCEWVS		DSVKG			SLKPEDTAVYYCVI		GRGSP		TVSS
PMP6G8	3	3			WVROAPGK		AISADSSTKNYA			RFTISRDNNAKNTLYLOMN				ASQGTQV
	7	8			DCEWVS		DSVKG			SLKSEDVAVYYCVI		GRGSP		TVSS
	2	9	SFGMS		WVRDAPGE		AISADSSDKRYA			RFTISRDNNAKNTLYLOMN		GRGSP		ASQGTQV
PMP6A5	3	3			GLEWVS		DSVKG			SLKSEDVAVYYCVI				TVSS
	7	8			WVRVAPGK		DSVKG			RFTISRDNNAKNTLYLOMN				RGQGTQV
	3	8	SFGMS		GLERIS		RDISTGGGYSYY			SLKPEDTALYYCAK		DREAQVDTLD		TVSS
PMP6G7	3	3			NYWIMY		ADSVKG			RFTISRDNNAKNTLYLOMN		FDY		TVSS
	7	8					ADSVKG			SLKPEDTALYYCAK				TVSS
	4	1												TVSS

- Otro aspecto de la invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se describe en la presente que además comprende al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-INF-gamma, un polipéptido del receptor de anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor anti-IFN-gamma.
- 5 Otro aspecto de la invención es un procedimiento de tratar una enfermedad o afección autoinmune mencionado en la presente, que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de un polipéptido anti-TNF-alfa descrito y reivindicado en la presente, que además comprende al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-INF-gamma, polipéptido del receptor de anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor de anti-IFN-gamma, tales polipéptidos se unen entre sí que se describen a continuación.
- 10 Tales constructos multiespecíficos pueden tener mejor potencia como compuesto terapéutico inflamatorio respecto de los constructos mono-específicos.
- Un aspecto de la invención es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-INF-gamma, polipéptido del receptor de anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor de anti-IFN-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.
- 15 Un aspecto de la invención es un procedimiento para tratar la enfermedad autoinmune que comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de un polipéptido anti-TNF-alfa descrito y reivindicado en la presente y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-INF-gamma, polipéptido del receptor de anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor de anti-IFN-gamma en forma simultánea, separada o secuencial.
- 20 Otro aspecto de la invención es un kit que contiene un polipéptido anti-TNF-alfa descrito y reivindicado y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-INF-gamma, polipéptido del receptor de anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor de anti-IFN-gamma para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto. Un aspecto de la invención es que el kit se puede usar de acuerdo con la invención. Un aspecto de la invención es que el kit se puede usar para tratar las enfermedades mencionadas en la presente.
- 25 Por administración simultánea se entiende que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo. Por ejemplo, como una mezcla de polipéptidos o una composición que comprende dichos polipéptidos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación una solución administrada por vía intravenosa, un comprimido, líquido, crema tópica, etc., en los que cada preparación comprende los polipéptidos de interés.
- 30 Por administración separada se entiende que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo. Los polipéptidos se presentan en el kit como preparaciones no mezcladas separadas. Por ejemplo, los polipéptidos diferentes pueden estar presentes en el kit como comprimidos individuales. Los comprimidos se pueden administrar al sujeto al tragar ambos comprimidos al mismo tiempo, o un comprimido directamente después del otro.
- 35 Por administración secuencial se entiende que los polipéptidos se administran a un sujeto en forma secuencial. Los polipéptidos se presentan en el kit como preparaciones no mezcladas separadas. Existe un intervalo de tiempo entre las dosis. Por ejemplo, un polipéptido se podría administrar hasta 336, 312, 288, 254, 240, 216, 192, 168, 144, 126, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1, o 0,5 horas después del otro componente.
- 40 En la administración secuencial, un polipéptido se puede administrar una vez, o cualquier número de veces y en varias dosis antes y/o después de la administración de otro polipéptido. La administración secuencial se puede combinar con administración simultánea o secuencial.
- 45 Los usos médicos del polipéptido anti-TNF-alfa que se describe a continuación, también se aplican en la composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en el polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido del receptor de anti-TNF-alfa y polipéptido del receptor de anti-IFN-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto que se describió anteriormente en la presente.
- Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en la presente, en el que el número de nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa es dos o más. Tales polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen la ventaja de una afinidad funcional inusualmente alta por el blanco, y exhiben propiedades inhibitorias mucho más altas que las esperadas en comparación con sus contrapartes monovalentes.
- 50 Los polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen afinidades funcionales que son varios órdenes de magnitud más altos de que los polipéptidos anti-TNF-alfa monovalentes originales. Los inventores han hallado que las afinidades funcionales de estos polipéptidos multivalentes son mucho más altas que los informados en la técnica previa para los anticuerpos bivalentes y multivalentes. De modo sorprendente, los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención ligados entre sí directamente o por medio de una secuencia ligadora corta muestran las afinidades funcionales altas esperadas teóricamente con los anticuerpos de cuatro cadenas multivalentes convencionales.
- 55

Los inventores han hallado que tales actividades funcionales muy aumentadas se pueden detectar preferentemente con antígenos compuestos de proteínas multidominio y multiméricas, sea en ensayos de unión o ensayos funcionales, por ejemplo ensayos de citotoxicidad.

5 Los Nanocuerpos se pueden unir para formar cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente que comprenden más de un Nanocuerpo mediante los procedimientos conocidos en la técnica o cualquier procedimiento futuro. Por ejemplo, ellos se pueden fusionar por entrecruzamiento químico por la reacción de los residuos de aminoácidos con un agente derivatizante orgánico tal como se describe en Blatter et al, Biochemistry 24,1517-1524; EP294703. Alternativamente, el nanocuerpo se puede fusionar genéticamente al nivel del AD, es decir, un constructo de polinucleótido formado que codifica el constructo de polipéptido completo que comprende uno o más nanocuerpos anti-blanco y uno o más de nanocuerpos anti-proteína sérica. Un procedimiento para producir constructos de polipéptidos de V_{HH} bivalente o multivalente en la solicitud de patente PCT WO 96/46103. Una manera de unir nanocuerpos múltiples es por medio de la vía genética por la unión a las secuencia codificadoras del nanocuerpo sea directamente o por medio de un ligador del péptido. Por ejemplo, el extremo C-terminal del primer Nanocuerpo se puede unir al extremo N-terminal del próximo nanocuerpo. Este modo de unión se puede extender a fin de unir nanocuerpos adicionales para la construcción y producción de tri-, tetra-, etc. constructos funcionales.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los Nanocuerpos se unen entre sí directamente sin uso de un ligador. En forma contraria a la unión de los anticuerpos voluminosos convencionales donde se necesita una secuencia ligadora para retener la actividad de unión en las dos subunidades, los polipéptidos de la invención se pueden ligar directamente y de este modo evitar los potenciales problemas de la secuencia ligadora, tal como la antigenicidad cuando se administra a un sujeto humano, inestabilidad de la secuencia ligadora que lleva a la disociación de las subunidades.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, los Nanocuerpos se unen entre sí por medio de una secuencia ligadora peptídica. Tal secuencia ligadora puede ser una secuencia natural o una secuencia no natural. Se espera que la secuencia ligadora no sea inmunogénica en el sujeto al que se administra el polipéptido anti-TNF-alfa. La secuencia ligadora puede proporcionar suficiente flexibilidad al polipéptido anti-TNF-alfa multivalente, al mismo tiempo que es resistente a la degradación proteolítica. Un ejemplo no limitante de una secuencia ligadoras es una que puede derivar de la región bisagra de los V_{HH} descritos en el documento WO 96/34103.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, los nanocuerpos multivalentes que comprende más de dos nanocuerpos se pueden ligar entre sí en forma directa o por medio de un secuencia ligadora. Tales constructos son difíciles de producir con anticuerpos convencionales y debido al impedimento estático de las subunidades voluminosas, se perderá funcionalidad o disminuirá mucho en vez de aumentar considerablemente como se observa con los V_{HH} de la invención en comparación con el constructo monovalente.

Los constructos de polipéptido descritos en la presente pueden ser obtenidos por los profesionales expertos de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica o cualquier procedimiento futuro. Por ejemplo, los V_{HH} se pueden obtener mediante los procedimientos conocidos en la técnica tal como por inmunizar un camello y obtener hibridomas de a partir de los mismos, o por la clonación de una biblioteca de nanocuerpos mediante técnicas de biología molecular conocidas en la materia y posterior selección por medio de despliegue en fago.

De acuerdo con un aspecto de la invención un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa descrito y reivindicado en la presente. De acuerdo con otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa descrito y reivindicado en la presente. De acuerdo con otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa descrito y reivindicado en la presente puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. De acuerdo con otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa descrito y reivindicado en la presente. De acuerdo con un aspecto de la invención un polipéptido anti-TNF-alfa puede comprender a secuencia de un polipéptido anti-TNF-alfa descrito y reivindicado en la presente.

De acuerdo con un aspecto de la invención un Nanocuerpo usado para formar un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser un nanocuerpo completo (por ejemplo un V_{HH}) o a secuencia homóloga de este. De acuerdo con otro aspecto de la invención, un Nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de un nanocuerpo completo. De acuerdo con otro aspecto de la invención, un Nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de un nanocuerpo completo. De acuerdo con otro aspecto de la invención, un Nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un nanocuerpo completo.

Como se usa en la presente, una secuencia homóloga de la presente invención puede comprender adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos, que no alteran sustancialmente las características funcionales de los polipéptidos de la invención. El número de supresiones o sustituciones de aminoácido es preferentemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, o 66, 67, 68, 69 o 70 aminoácidos.

Una secuencia homóloga de acuerdo con la presente invención puede ser un polipéptido modificado por la adición, supresión o sustitución de aminoácidos, dicha modificación no altera sustancialmente las características funcionales en comparación el polipéptido no modificado.

5 Una secuencia homóloga de acuerdo con la presente invención puede ser un polipéptido modificado por la adición, supresión o sustitución de aminoácidos dicha modificación no altera sustancialmente las características funcionales en comparación el polipéptido no modificado.

Una secuencia homóloga de acuerdo con la presente invención puede ser una secuencia que existe en otras especies de camélidos tales como, por ejemplo, camello, dromedario, llama, alpaca, guanaco etc.

10 Cuando la secuencia homóloga indica identidad de secuencia, significa una secuencia que presenta una alta identidad de secuencia (más de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de identidad de secuencia) con secuencia original y preferentemente se caracteriza por propiedades similares de la secuencia original, a saber afinidad, dicha identidad se calcula mediante procedimientos conocidos.

Alternativamente, una secuencia homóloga también puede ser cualquier secuencia de aminoácidos resultante de las sustituciones permitidas en numerosas posiciones de la secuencia original de acuerdo con la siguiente fórmula:

15 Ser sustituida por Ser, Thr, Gly, y Asn;

Arg sustituida por uno de Arg, His, Gln, Lys, y Glu;

Leu sustituida por uno de Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, y Val;

Pro sustituida por uno de Pro, Gly, Ala, y Thr;

Thr sustituida por uno de Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His, y Gln;

20 Ala sustituida por uno de Ala, Gly, Thr, y Pro;

Val sustituida por uno de Val, Met, Tyr, Phe, He, y Leu;

Gly sustituida por uno de Gly, Ala, Thr, Pro, y Ser;

Ile sustituida por uno de He, Met, Tyr, Phe, Val, y Leu;

Phe sustituida por uno de Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val, y Leu;

25 Tyr sustituida por uno de Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val, y Leu

His sustituida por uno de His, Glu, Lys, Gln, Thr, y Arg;

Gln sustituida por uno de Gln, Glu, Lys, Asa, His, Thr, y Arg;

Asn sustituida por uno de Asn, Glu, Asp, Gln, y Ser;

Lys sustituida por uno de Lys, Glu, Gln, His, y Arg;

30 Asp sustituida por uno de Asp, Glu, y Asn;

Glu sustituida por uno de Glu, Asp, Lys, Mn, Gln, His, y Arg;

Met sustituida por uno de Met, Phe, Ile, Val, Leu, y Tyr.

35 Una secuencia homóloga de nucleótidos de acuerdo con la presente invención se puede referir a las secuencias de nucleótidos de más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 o 1000 nucleótidos capaces de hibridar al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia original, en condiciones de hibridación rigurosas (tal como las descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning, Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York).

Como se usa en la presente, una porción funcional se refiere a una secuencia de un Nanocuerpo que es tamaño suficiente de modo que se mantiene la interacción de interés con afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.

40 Alternativamente, una porción funcional comprende una supresión parcial de la secuencia de aminoácidos completa y aún mantiene el sitio de unión y dominio de la proteína necesario para la unión de y la interacción con el blanco.

Como se usa en la presente, una porción funcional se refiere a menos de 100% de la secuencia completa (por ejemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60% 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% etc.), pero comprende 5 o más aminoácidos o 15 o más nucleótidos.

Los blancos mencionados en la presente tales como TNF-alfa, receptor de TNF-alfa, proteínas séricas (por ejemplo albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina, fibrinógeno) e IFN-gamma, receptor de IFN-gamma pueden ser fragmentos de dichos blancos. En consecuencia un blanco también es un fragmento de dicho blanco, capaz de inducir una respuesta inmune. Un blanco también es un fragmento de dicho blanco, capaz de unirse a un nanocuerpo originado contra el blanco de longitud completa.

Un fragmento como se usa en la presente se refiere a menos de 100% de la secuencia (por ejemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% etc.), pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. Un fragmento es de suficiente longitud de modo de mantener la interacción de interés con una afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.

Un fragmento como se usa en la presente también se refiere a inserciones, supresiones y sustituciones opcionales de uno o más aminoácidos que no alteran sustancialmente la capacidad del blanco de unirse a un Nanocuerpo originado contra el blanco tipo salvaje. El número de inserciones supresiones o sustituciones de aminoácidos es preferentemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 aminoácidos.

Una secuencia homóloga de la presente invención puede incluir un polipéptido anti-TNF-alfa descrito y reivindicado en la presente que ha sido humanizado. La humanización de los anticuerpos de la nueva clase de V_{HH} también reduce la posibilidad de reacción inmunológica no deseada en un individuo humano después de la administración.

Una realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar polipéptidos modificados sobre la base de los anticuerpos de llama por la determinación de los residuos de aminoácidos del dominio variable del anticuerpo (V_{HH}) que se puede modificar sin disminuir la afinidad nativa del dominio para el antígeno y a la vez reducir su inmunogenicidad con respecto a una especie heteróloga; el uso de los V_{HH} que tienen modificaciones en los residuos identificados que son útiles para la administración a especies heterólogas; y al V_{HH} así modificado.

Más específicamente, la invención se refiere a la preparación de V_{HH} modificados, que se modifican para la administración a los seres humanos, los V_{HH} resultantes mismos y el uso de tales V_{HH} "humanizados" en el tratamiento de enfermedades en los seres humanos. Por humanizado se entiende mutado de modo que la inmunogenicidad después de la administración en pacientes humanos sea menor o inexistente. La humanización de un polipéptido, de acuerdo con la presente invención, comprende una etapa de reemplazar uno o más de los aminoácidos de camélidos por su contraparte humana que se halla en la secuencia de consenso humana, sin que el polipéptido pierda su carácter típico, es decir la humanización no afecta significativamente la capacidad de unión del antígeno del polipéptido resultante. Tales procedimientos son conocidos por el destinatario experto.

La humanización de los nanocuerpos de camélidos requiere la introducción y mutagénesis de una cantidad limitada de aminoácidos en una cadena de polipéptido simple. Esto es en contraste con la humanización de scFv, Fab, (Fab)₂ e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en las dos cadenas, la cadena liviana y la cadena pesada y la conservación del ensamblaje de ambas cadenas.

Como se describe en el documento WO 04/041862, un nanocuerpo anti-TNF se puede humanizar. La humanización por ejemplo puede involucrar la mutagénesis de residuos en FR1 en la posición 1 y 5 que fueron introducidos por el cebador usado para la clonación del repertorio y no aparece naturalmente en la secuencia de llama. La mutagénesis de estos residuos no produjo la pérdida de unión y/o actividad de inhibición. La humanización también puede involucrar la mutagénesis de residuos en FR3 en la posición 74, 76, 83, 84, 93. La mutagénesis de de estos residuos no produjo una pérdida drástica de actividad de unión y/o inhibición. La combinación de las mutaciones de FR1 y FR3 por ende no afectaron la actividad de unión y/o inhibición. La humanización también puede involucrar la mutagénesis de residuos en FR4 en la posición 108. La mutagénesis de Q108L produjo menor nivel de producción en Escherichia coli. La posición 108 se expone al disolvente en el V_{HH} de camélido, mientras que en los anticuerpos humanos esta posición está sepultada en la interfaz VH-VL (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). En los VH aislados la posición 108 está expuesta al disolvente. La introducción de una Leu hidrófoba no polar en vez de Gln polar no cargado puede tener un efecto drástico sobre el pegamiento/estabilidad intrínseca de la molécula. Asimismo, el reemplazo de los residuos hidrófilos por residuos hidrófobos humanos en las posiciones 44 y 45 (E44G y R45L), no tuvieron efecto sobre la unión y/o inhibición. Sin embargo, se observó pérdida de unión y/o actividad de inhibición cuando se introdujeron F37V y F47W. Los datos de modelado confirmaron el residuo crítico 37 para conservar la integridad de la conformación del bucle de CDR3 y en consecuencia sobre la actividad (toda la numeración de acuerdo con Kabat).

De acuerdo con una realización de la presente invención, la humanización involucrar el reemplazo de alguno de los siguientes residuos solos o en combinación:

- FR1 posición 1, 5, 28 y 30,

- el aminoácido marcador en la posición 44 y 45 en FR2,

- FR3 residuos 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94,

- y las posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4 ;

- numeración de acuerdo con la numeración de Kabat.

5 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa, o un ácido nucleico capaz de codificar dicho polipéptido para usar en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos relacionados con los procesos inflamatorios. TNF-alfa está involucrado en los procesos inflamatorios, y el bloqueo de la acción de TNF-alfa acción puede tener un efecto antiinflamatorio, que es muy conveniente en ciertos estados de enfermedad tales como, por ejemplo, enfermedad de Crohn. Los Ejemplos demuestran V_{HH} de acuerdo con la invención que se unen a TNF-alfa y además, bloquean su unión al receptor TNF-alfa.

10 Los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención son aplicables a las enfermedades autoinmunes, tales como enfermedad de Addison (adrenal), enfermedades autoinmunes del oído (oído), enfermedades autoinmunes de los ojos (ojo), hepatitis autoinmune (hígado), parotiditis autoinmune (glándulas parótidas), enfermedad de Crohn (intestino), Diabetes Tipo I (páncreas), epididimitis (epidídimo), glomerulonefritis (riñones), enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Guillain-Barre (células nerviosas), enfermedad de Hashimoto (tiroides), anemia hemolítica (eritrocitos), Lupus eritematoso sistémico (múltiples tejidos), infertilidad masculina (esperma), esclerosis múltiple (células nerviosas), miastenia gravis (unión neuromuscular), pénfigo (principalmente piel), psoriasis (piel), fiebre reumática (corazón y articulaciones), artritis reumatoide (revestimiento de la articulación), sarcoidosis (múltiples tejidos y órganos), escleroderma (piel y tejidos conectivos), síndrome de Sjogren (glándulas exocrinas, y otros tejidos), espondiloartropatías (esqueleto axial y otros tejidos), tiroiditis (tiroides), Vasculitis (vasos sanguíneos).

20 Dentro del paréntesis está el tejido afectado por la enfermedad. Este listado de enfermedades autoinmunes se considera ejemplificativo más que inclusivo.

25 Las enfermedades autoinmunes en las que los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención se pueden aplicar incluyen, por ejemplo, SIDA, alergia atópica, asma bronquial, eczema, lepra, esquizofrenia, depresión hereditaria, trasplante de tejidos y órganos, síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, autismo, epilepsia, fenómeno de Arthus, anafilaxis, y adicción a alcohol y fármacos. En las enfermedades autoinmunes identificadas anteriormente, el tejido afectado es el blanco primario, en otros casos es el blanco secundario. Estas afecciones son en parte o principalmente

síndromes autoinmunes. En consecuencia, para tratarlos, es posible usar los mismos procedimientos, o aspectos de los mismos procedimientos que se describen en la presente, algunas veces en combinación con otros procedimientos.

30 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa de acuerdo con la invención, o un ácido nucleico capaz de codificar dicho polipéptido para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con los procesos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio y esclerosis múltiple.

35 Los polipéptidos y ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un sujeto por vías convencionales, tal como vía intravenosa. Sin embargo, una propiedad especial de los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención es que penetran barreras tales como membranas tisulares y/o tumores y actúan localmente en ellos y son suficientemente estables para resistir los ambientes extremos tal como en el estómago. En consecuencia, otro aspecto de la presente invención se refiere a la administración del polipéptido anti-TNF-alfa descrito y reivindicado en la presente.

40 Cuando los Nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención se usan para, o están destinados al uso para la prevención o tratamiento de enfermedades y trastornos del aparato gastrointestinal, en particular por medio de la administración oral u otra administración en el aparato gastrointestinal, usualmente no será necesario usar polipéptidos de la invención que tengan aumento de la vida media en suero (es decir, que han sido pegilados o que contienen un Nanocuerpo dirigido contra una proteína sérica). En consecuencia, para tales indicaciones, se pueden usar los polipéptidos de la invención que solo contienen los Nanocuerpos de la invención. En particular, se ha hallado que en la administración oral para la prevención y tratamiento de enfermedades o trastornos del aparato gastrointestinal asociados con y/o mediados por TNF-alfa (tal como IBD y las otras enfermedades y trastornos del aparato gastrointestinal mencionados anteriormente), se puede preferir el uso de un Nanocuerpo monovalente de la invención o de un polipéptido de la invención que consiste esencialmente en un Nanocuerpo monovalente de la invención. Para otras indicaciones, tales como el tratamiento de artritis reumatoide (RA), se puede preferir el uso de un Nanocuerpo bivalente de la invención. Cuando tal Nanocuerpo debe alcanzar su sitio de acción deseado por medio del torrente sanguíneo, se puede preferir el uso de un polipéptido de la invención que tiene un aumento de vida media en el suero.

Un sujeto de acuerdo con la invención puede ser cualquier mamífero susceptible al tratamiento con polipéptidos terapéuticos.

55 La administración oral de los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención produce la provisión de tales moléculas en una forma activa en el colon en los sitios locales que son afectados por el trastorno. Estos sitios pueden estar muy inflamados y contener células productoras de TNF-alfa. Los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención que se unen a TNF-alfa pueden neutralizar el TNF-alfa en forma local, evitando la distribución a lo largo del cuerpo completo y de este

5 modo se limitan los efectos secundarios negativos. Los microorganismos genéticamente modificados tales como *Micrococcus lactis* son capaces de secretar el anticuerpo o porciones funcionales de este. Tales microorganismos modificados se pueden usar como vehículos para la producción local y liberación de anticuerpos o sus porciones funcionales en el intestino. Por medio de una cepa que produce un polipéptido anti-TNF-alfa, se puede tratar el síndrome intestinal inflamatorio.

Otro aspecto de la invención involucra la liberación de los polipéptidos anti-TNF por medio de la expresión en superficie o la secreción de bacterias no invasivas, tales como organismos huésped Gram-positivos como *Lactococcus spec* usando un vector tal como se describe en el documento WO 00/23471.

10 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para usar en el tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el ambiente gástrico sin que se inactive la sustancia.

15 Los ejemplos de trastornos son cualquiera que causa inflamación, que incluyen pero sin limitación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, y esclerosis múltiple. Como es conocido por los expertos en técnica, una vez en posesión de dicho constructo de polipéptido, se puede aplicar la tecnología de la formulación para liberar una cantidad máxima polipéptido en la ubicación correcta (en el estómago, en el colon, etc.). Este procedimiento de liberación es importante para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos cuyos blancos se ubican en el sistema intestinal.

20 Un aspecto de la invención es un procedimiento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno susceptible a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el ambiente gástrico sin inactivarse, por la administración en forma oral a un sujeto de una polipéptido anti-TNF alfa que se describe en la presente.

25 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa que se describe en la presente para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el ambiente gástrico sin inactivarse.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en el sistema intestinal sin que dicha sustancia se inactive, por la administración en forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

30 Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en el torrente sanguíneo de un sujeto sin que se inactive la sustancia, por la administración en forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para usar en el tratamiento, prevención y/o aliviar los síntomas o trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

35 Los ejemplos de trastornos son cualquiera que causa inflamación, que incluye pero sin limitación artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, y esclerosis múltiple. En un ejemplo no limitante, una formulación de acuerdo con la invención comprende un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente, en la forma de un gel, crema, supositorio, película, o en la forma de una esponja o como un anillo vaginal que libera lentamente el ingrediente activo con el tiempo (tales formulaciones se describen en los documentos EP 707473, EP 684814, US 5629001).

Un aspecto de la invención es un procedimiento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal, por la administración vaginal y/o rectal a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

45 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa que se describe en la presente para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en el tracto vaginal y/o rectal sin que dicha sustancia se inactive, por la administración en el tracto vaginal y/o rectal de un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

50 Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en el torrente sanguíneo de un sujeto sin que dicha sustancia se inactive, por la administración en el tracto vaginal y/o rectal de un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente, para usar en el tratamiento, prevención y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o

polipéptido de la invención administrado en la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón.

5 Los ejemplos de trastornos son cualquiera que causa inflamación, que incluye pero sin limitación artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, y esclerosis múltiple. En un ejemplo no limitante, una formulación de acuerdo con la invención, comprende un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente en la forma de un spray nasal (por ejemplo, un aerosol) o inhalador. Debido a que el constructo de polipéptido es pequeño, puede alcanzar su objetivo mucho más efectivamente que las moléculas de IgG terapéuticas.

10 Un aspecto de la invención es un procedimiento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención liberado en las vías respiratorias superiores y pulmón, por la administración a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente, por inhalación a través de la boca o nariz.

Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la nariz, vías respiratorias superiores y/o pulmón, sin que dicho polipéptido se inactive.

15 Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en la nariz, vías respiratorias superiores y pulmón sin inactivación, por la administración en la nariz, vías respiratorias superiores y pulmón de un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

20 Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en el torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivación por la administración en la nariz, vías respiratorias superiores y pulmón de un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

25 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para usar en el tratamiento, prevención y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal. Debido a su tamaño pequeño, un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente puede atravesar la mucosa intestinal y alcanzar el torrente sanguíneo más eficientemente en sujetos que sufren de los trastornos que causan un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal, por ejemplo enfermedad de Crohn.

30 Un aspecto de la invención es un procedimiento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal, por la administración en forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

35 Este proceso aun se puede mejorar adicionalmente en un aspecto adicional de la presente invención – el uso de portadores de transporte activos. En este aspecto de la invención, V_{HH} se fusiona a un portador que aumenta la transferencia a través de la pared intestinal en el torrente sanguíneo. En un ejemplo no limitante, este "portador" es un segundo V_{HH} que se fusiona al V_{HH} terapéutico. Tales constructos de fusión se obtienen por medio de procedimientos conocidos en la técnica. El "portador" V_{HH} se une específicamente a un receptor de la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

40 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir o y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en la mucosa intestinal sin inactivarse, por la administración en forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa de la invención.

45 Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en el torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivarse, por la administración en forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa de la invención.

50 Este proceso aun se puede mejorar adicionalmente en un aspecto adicional de la presente invención – el uso de portadores de transporte activos. En este aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa como se describe en la presente se fusiona a un portador que aumenta la transferencia a través de la pared intestinal en el torrente sanguíneo. En un ejemplo no limitante, este "portador" es un V_{HH} que se fusiona a dicho polipéptido. Tales constructos de fusión se obtienen por medio de procedimientos conocidos en la técnica. El "portador" V_{HH} se une específicamente a un receptor de la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para usar en el tratamiento, prevención y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua en forma efectiva.

Los ejemplos de trastornos son cualquiera que causa inflamación, que incluye pero sin limitación artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, y esclerosis múltiple. A formulación de dicho constructo de polipéptido que se describe en la presente, por ejemplo, un comprimido, spray, la gota se coloca debajo de la lengua y se adsorbe a través de las membranas mucosas en la red capilar debajo de la lengua.

5 Un aspecto de la invención es un procedimiento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua en forma efectiva, por la administración sublingual a un sujeto un polipéptido anti-TNF alfa que se describe en la presente.

10 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua en forma efectiva.

15 Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a los tejidos debajo de la lengua sin inactivarse, por la administración sublingual a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de es la invención en el torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivarse, por la administración en forma oral a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

20 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente para usar en el tratamiento, prevención y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel en forma efectiva.

25 Los ejemplos de trastornos son cualquiera que causa inflamación, que incluye pero sin limitación artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, y esclerosis múltiple. Una formulación de dicho constructo de polipéptido, por ejemplo, una crema, película, spray, gota, parche se coloca en la piel y pasa a través de ella.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel en forma efectiva, por la administración tópica a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa que se describe en la presente.

30 Otra realización de la presente invención es un uso de polipéptido anti-TNF-alfa que se describe en la presente para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles a la modulación por un Nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel en forma efectiva.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención a la piel sin inactivarse, por la administración tópica a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

35 Un aspecto de la invención es un procedimiento para liberar un Nanocuerpo o polipéptido de la invención en el torrente sanguíneo de un sujeto, por la administración tópica a un sujeto de polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente.

En otra realización de la presente invención, un polipéptido anti-TNF-alfa también comprende un nanocuerpo portador (por ejemplo V_{HH}) que actúa como un portador de transporte activo para el transporte de dicho polipéptido anti-TNF-alfa, desde el lumen pulmonar a la sangre.

40 Un polipéptido anti-TNF-alfa que además comprende a portador que se une específicamente a un receptor presente en la superficie de la mucosa (células epiteliales bronquiales) que produce el transporte activo del polipéptido desde el lumen pulmonar a la sangre. El nanocuerpo portador se puede fusionar al constructo de polipéptido. Tales constructos de fusión se pueden obtener mediante procedimientos conocidos en la técnica y se describen en la presente. El nanocuerpo "portador" se une específicamente a un receptor sobre la superficie de la mucosa que induce una transferencia activa a través de la superficie.

45 Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para determinar cuáles nanocuerpos (por ejemplo V_{HH}) se transportan activamente en el torrente sanguíneo después de la administración nasal. De modo similar, una biblioteca de fago de V_{HH} inactivo o inmune se puede administrar por vía nasal y después de diferentes puntos de tiempo después de la administración, se pueden aislar sangre u órganos para rescatar los fagos que se han transportado activamente en el torrente sanguíneo. Un ejemplo no limitante de un receptor para el transporte activo desde el lumen pulmonar al torrente sanguíneo es el receptor de Fc (FcRn). Un aspecto de la invención incluye las moléculas de V_{HH} identificadas por el procedimiento. Tal V_{HH} posteriormente se puede usar como un portador V_{HH} para la administración de un V_{HH} terapéutico al correspondiente blanco en el torrente sanguíneo después de la administración nasal.

En un aspecto de la invención, se puede usar un polipéptido anti-TNF-alfa que se desvela en la presente, a fin de

detectar agentes que modulen la unión del polipéptido a TNF-alfa. Cuando se identifican en un ensayo que mide unión o dicho desplazamiento del polipéptido solo, los agentes deberán someterse al análisis funcional para determinar si ellos pueden modular la acción del antígeno in vivo.

5 En un ejemplo de un experimento de desplazamiento, el fago o las células que expresan TNF-alfa o un fragmento de estas se incuban en la solución tampón de unión con el polipéptido de la invención que ha sido marcado, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un modulador candidato. Para validar y calibrar el ensayo, se pueden realizar reacciones de competición control que usan concentraciones crecientes de dicho polipéptido y que están sin marcar. Después de la incubación, las células se lavan intensivamente, y se mide el polipéptido marcado unido según sea apropiado para la marca determinada (por ejemplo, contador de centelleo, fluorescencia, etc.). Una disminución de
10 al menos 10% de la cantidad de polipéptido marcado unido en presencia de modulador candidato indica el desplazamiento de la unión por parte del modulador candidato. Se consideran que los moduladores candidatos se unen específicamente en este u otros ensayos descritos en la presente si ellos desplazan el 50% del polipéptido marcado (dosis de sub-saturación del polipéptido) a una concentración de 1 μ M o menos.

15 Alternativamente, la unión o desplazamiento de unión se puede controlar por la resonancia de anión superficial (SPR). Los ensayos de resonancia de anión superficial se pueden usar como un procedimiento cuantitativo para medir la unión entre dos moléculas por el cambio de la masa cerca de sensor inmovilizado causado por la unión o pérdida de unión del polipéptido de la invención de la fase acuosa al TNF-alfa inmovilizado en una membrana sobre el sensor. Este cambio de masa se mide como unidades de resonancia versus tiempo después de la inyección o remoción de dicho polipéptido o modulador candidato y se mide mediante un Biosensor Biacore (Biacore AB). TNF-alfa se puede inmovilizar, por
20 ejemplo en un chip sensor (por ejemplo, chip CM5 de grado de investigación; Biacore AB) en una membrana lipídica fina de acuerdo con procedimientos descritos por Salamon et al. (Salamon et al., 1996, Biophys J. 71: 283-294; Salamon et al., 2001, Biophys. J. 80: 1557-1567; Salamon et al., 1999, Trends Biochem. Sci. 24: 213-219, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia). Sarrio et al. demostraron que la SPR se puede usar para detectar la unión del ligando al receptor de adenosina GPCR A(1) inmovilizado en una capa lipídica en el chip (Sarno et al., 2000, Mot. Célula. Biol. 20: 5164-5174, incorporado en la presente por referencia). Las condiciones para la unión de un polipéptido de la invención al TNF-alfa en un ensayo SPR pueden ser ajustadas por los expertos en la técnica mediante las condiciones informadas por Sarrio et al. como punto de partida.

30 El SPR puede analizar moduladores de unión de al menos dos maneras. Primero, un polipéptido de la invención se puede pre-unir al TNF-alfa inmovilizado seguido por la inyección de un modulador candidato a una concentración que varía de 0,1 nM a 1 μ M. El desplazamiento del polipéptido unido se puede cuantificar, lo que permite la detección de la unión del modulador. Alternativamente, el TNF-alfa unido a membrana se puede preincubar con un modulador candidato y estimular con el polipéptido de la invención. Una diferencia en la afinidad de unión entre dicho polipéptido y el TNF-alfa pre-incubado con el modulador, en comparación con la afinidad entre dicho polipéptido y TNF-alfa en ausencia del modulador demostrará la unión o desplazamiento de dicho polipéptido en presencia del modulador. En cualquier
35 ensayo, una disminución de 10% o más en la cantidad de dicho polipéptido unido en presencia del modulador candidato, con respecto a la cantidad de dicho polipéptido unido en ausencia del modulador candidato indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y dicho polipéptido.

Otro procedimiento de detectar la inhibición de unión de, por ejemplo, un polipéptido de la invención, a TNF-alfa usa la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un fenómeno de mecánica cuántica que
40 ocurre entre un dador de fluorescencia (D) y un aceptor de fluorescencia (A) en estrecha proximidad entre sí (usualmente < 100 Å de separación) si el espectro de emisión de D se superpone con el espectro de excitación de A. Las moléculas para analizar, por ejemplo un polipéptido de la invención y un TNF-alfa se marcan con un par complementario de fluoróforos dador y aceptor. Mientras que están unidos estrechamente por la interacción TNF-alfa: polipéptido, la fluorescencia emitida después de la excitación del fluoróforo dador tendrá una longitud de onda diferente que la emitida en respuesta a la longitud de onda de excitación cuando dicho polipéptido y TNF-alfa no están unidos, lo que proporciona la cuantificación de las moléculas unidas versus no unidas por la medición de la intensidad de emisión en cada longitud de onda. Los fluoróforos dadores con los que se marcan el TNF-alfa son bien conocidos en la técnica, De particular interés, son las variantes de A. Victoria GFP conocido como Cyan FP (CEP, Dador (D)) y Amarillo FP (YEP, Aceptor (A)). A modo de ejemplo, la variante YFP se puede obtener como una proteína de fusión con TNF-alfa.
50 Los vectores para la expresión de las variantes de GFP como fusiones (Clontech) así como los reactivos marcados con fluoróforo (Molecular Probes) son conocidos en la técnica. La adición de un modulador candidato a la mezcla de polipéptido marcado con fluorescencia y YFP-TNF-alfa producirá una inhibición de la transferencia de energía evidenciada, por ejemplo, por una disminución en la fluorescencia YFP con respecto a una muestra sin el modulador candidato. En un ensayos que usa FRET para la detección de la interacción de TNF-alfa: polipéptido, una disminución
55 de 10% o mayor de la intensidad de emisión de fluorescencia en la longitud de onda del aceptor en las muestras que contiene un modulador candidato, con respecto a las muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción TNF-alfa:polipéptido.

Una muestra que se usa en la presente puede ser cualquier muestra biológica que contiene TNF-alfa tal como muestras clínicas (por ejemplo, fracciones celulares, sangre entera, plasma, suero, tejido, células, etc.), derivadas de muestras clínicas, agrícolas, forenses, investigación, u otras posibles muestras. Las muestras clínicas pueden ser de origen humano o animal. La muestra analizada puede ser de naturaleza sólida o líquida. Es evidente que cuando se usan materiales sólidos, estos primero se disuelven en una solución adecuada.

Una variación del FRET usa la inactivación de la fluorescencia para controlar las interacciones moleculares. Una molécula del par de interacción se puede marcar con un fluoróforo, y la otra con una molécula que inactiva la fluorescencia del fluoróforo cuando se colocan en estrecha aposición con esta. Un cambio de fluorescencia después de la excitación es indicativo de un cambio en la asociación de las moléculas marcados con el par fluoróforo:inactivador. Generalmente, un aumento de la fluorescencia del TNF-alfa marcado es indicativo que el polipéptido anti-TNF-alfa que porta el inactivador se ha desplazado. En los ensayos de inactivación, un aumento de 10% o mayor en la intensidad de la emisión fluorescente en las muestras que contienen un modulador candidato, con respecto a las muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa: polipéptido anti TNF-alfa.

Además de los procedimientos de resonancia de plasmón superficial y FRET, la medición de la polarización de la fluorescencia es útil para cuantificar la unión. El valor de polarización de fluorescencia para una molécula marcada con fluorescencia depende del tiempo de correlación rotacional o velocidad de giro. Los complejos, tal como los formados por TNF-alfa en asociación con un polipéptido anti-TNF-alfa marcado con fluorescencia, tienen valores de polarización más altos que el polipéptido marcado, no complejo. La inclusión de un inhibidor candidato de la interacción TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa produce polarización de fluorescencia, con respecto a una mezcla del inhibidor candidato, si el inhibidor candidato altera o inhibe la interacción de TNF-alfa con dicho polipéptido. La Polarización de fluorescencia es bien adecuada para la identificación de moléculas pequeñas que alteran la formación de complejos de TNF-alfa: polipéptido anti-TNF-alfa. Una disminución de 10% o más de la polarización de fluorescencia en las muestras que contiene un modulador candidato, con respecto a la polarización de fluorescencia en una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa : polipéptido anti-TNF-alfa.

Otra alternativa para controlar las interacciones de TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa usa un ensayo de biosensor. Los biosensores ICS se han descrito en la técnica (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; Cornell Li, Braach-Maksvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek I, y Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" Nature 1997, 187, 580). En esta tecnología, la asociación de TNF-alfa y un polipéptido anti-TNF alfa se acopla al cierre de los canales iónicos facilitado por gramicidina en bicapas de membranas suspendidas y en consecuencia a un cambio medible en la admitancia (similar a impedancia) del biosensor. Este método es lineal durante seis órdenes de magnitud de cambio de admitancia y es idealmente adecuado para el análisis de alto rendimiento de gran escala de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Un cambio de 10% o mayor (aumento o disminución) en la admitancia en una muestra que contiene un modulador candidato, con respecto a la admitancia de una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y dicho polipéptido. Es importante indicar que en los ensayos que analizan la interacción de TNF-alfa con un polipéptido anti-TNF-alfa, es posible que un modulador de la interacción no deba necesariamente interactuar en forma directa con el dominio de las proteínas que interactúan físicamente con dicho polipéptido. También es posible que un modulador interactúe en una ubicación retirada del sitio de interacción y cause, por ejemplo, un cambio conformacional del TNF-alfa. Los moduladores (inhibidores o agonistas) que actúan de esta manera, sin embargo son de interés como agentes para modular la unión de TNF-alfa a su receptor.

Cualquiera de los ensayos de unión se puede usar para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que se une a TNF-alfa, o que afecta la unión de, por ejemplo, un polipéptido de la invención para el TNF-alfa. Para realizar esto un TNF-alfa se hace reaccionar con dicho polipéptido en presencia o ausencia de la muestra, y unión del polipéptido se mide según sea apropiado para ensayo de unión usado. Una disminución de 10% o más en la unión de dicho polipéptido indica que la muestra contiene un agente que modula la unión de dicho polipéptido al TNF-alfa. Obviamente, el procedimiento generalizado anteriormente se podría aplicar fácilmente al análisis de los moduladores candidatos que alteran la unión entre cualquier polipéptido anti-TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga de este, una porción funcional de este, una porción funcional de una secuencia homóloga de este y TNF-alfa o un fragmento de este.

Una realización de la presente invención es un agente desconocido identificado por el procedimiento desvelado en la presente.

Una realización de la presente invención es un agente desconocido identificado por el procedimiento desvelado en la presente para usar en el tratamiento, prevención y/o aliviar los síntomas de trastornos relacionados en los procesos inflamatorios.

Otra realización de la presente invención es un uso de un agente desconocido identificado por el procedimiento desvelado en la presente para usar en el tratamiento, prevención y/o aliviar los síntomas de trastornos relacionados en los procesos inflamatorios.

Los ejemplos de trastornos incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio y esclerosis múltiple.

Una célula que es útil de acuerdo con la invención preferentemente se selecciona del grupo que consiste en célula bacterianas tales como, por ejemplo, E. coli, células de levadura tales como, por ejemplo, S. cerevisiae, P. pastoris, células de insecto o células de mamífero.

Una célula que es útil de acuerdo con la invención puede ser cualquier célula en que se puede introducir una secuencia

de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende un anti-TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga de este, una porción funcional de este o una porción funcional de una secuencia homóloga de este de acuerdo con la invención de modo que el polipéptido se exprese en niveles naturales o por encima de los niveles naturales, como se define en la presente. Preferentemente un polipéptido de la invención que se expresa en una célula exhibe farmacología normal o cerca de normal, como se define en la presente.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, una célula se selecciona del grupo que consiste en células CO57, una célula CHO, una célula LM(TK-), una célula NIH-3T3, célula HEK-293, célula K-562 o una célula de astrocitoma 1321NI pero también otras líneas celulares transferibles.

En general, "cantidad terapéuticamente efectiva", "dosis terapéuticamente efectiva" y "cantidad efectiva" significa la cantidad necesaria para obtener el resultado o resultados deseados (que modula la unión de TNF-alfa; tratar o prevenir la inflamación). Los expertos en la técnica reconocerá que la potencia y en consecuencia, una "cantidad efectiva" puede variar para los diversos compuestos que modulan la unión de TNF-alfa usada en la invención. Los expertos en la técnica pueden evaluar fácilmente la potencia del compuesto.

Como se usa en la presente, el término "compuesto" se refiere a un polipéptido anti-TNF-alfa de la presente invención, una composición, o un ácido nucleico capaz de codificar dicho polipéptido o un agente identificado de acuerdo con el procedimiento de detección descrito en la presente o dicho polipéptido que comprende uno o más aminoácidos derivatizados.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo no deseable, es decir, el material se puede administrar a un individuo junto con el compuesto sin causar ningún efecto biológico no deseable o interactuar de manera perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en que está contenido.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa que se describe en la presente es útil para tratar o prevenir afecciones en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto o composición.

Los polipéptidos anti-TNF de la presente invención son útiles para tratar o prevenir afecciones relacionados con artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio y esclerosis múltiple en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto o composición que se une a TNF-alfa.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa que se desvelan en la presente son útiles para tratar o prevenir afecciones en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de una combinación del compuesto con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa que se desvelan en la presente son útiles para tratar o prevenir afecciones relacionadas a artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio y esclerosis múltiple en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de una combinación del compuesto con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

La presente invención no se limita a la administración de formulaciones que comprenden un compuesto único de la invención. Está dentro del alcance de la invención proporcionar los tratamientos de combinación en que una formulación se administra a un paciente que lo necesita que comprende más de un compuesto de la invención.

Las afecciones mediadas por TNF-alfa incluyen, pero sin limitación artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio y esclerosis múltiple.

Un compuesto útil en la presente invención se puede formular como composiciones farmacéuticas y administrar a un huésped mamífero, tal como un paciente humano o un animal doméstico en una variedad de formas adaptadas para la vía de administración elegida, es decir, en forma oral o parenteral, por vías intranasal por inhalación, intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Un compuesto de la presente invención también se puede administrar mediante procedimientos de administración de la terapia génica. Ver, por ejemplo, Patente U.S. Núm. 5.399.346, que se incorpora por referencia en su totalidad. Mediante un procedimiento de administración de la terapia génica, las células primarias transfectadas con el gen para el compuesto de la presente invención adicionalmente se puede transfectar con promotores específicos del tejido para los órganos, tejido, injertos, tumores, o células blanco específicos.

En consecuencia, los presentes compuestos se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, en forma oral, en

combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Estos se pueden encapsular en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporan directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede combinar con uno o más excipientes y usados en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares.

Tales composiciones y preparaciones se deben contener al menos 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, obviamente, se puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 60% del peso de una forma de dosis unitaria dada. La cantidad del compuesto activo en tal composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosis efectivo.

5 Los comprimidos, pastillas, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener los siguientes: aglutinantes tales como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspártamo o un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria, o cereza. Cuando la forma de dosis unitaria es una cápsula, puede
10 contener además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros diversos materiales pueden estar presentes como cubiertas o modificar de otro modo la forma física de la forma de dosis unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, pastillas, o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como sabor de cereza o
15 naranja. Obviamente, cualquier material usado para preparar cualquier forma de dosis unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo también se puede administrar por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezclar con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y sus mezclas y en aceites. En las condiciones de conservación y uso ordinarias, estas preparaciones contienen un conservante para
20 evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosis farmacéuticas adecuadas para la inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que se adaptan para la preparación
25 extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables o infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la última forma de dosis debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un solvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y a similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y sus mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez
30 apropiada, por ejemplo, por la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede producir por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir por el uso de las
35 composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan por la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización con filtro. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilizado, que producen un polvo del
40 ingrediente activo más cualquier ingrediente activo adicional presente en las soluciones filtradas en forma estéril previamente.

Para la administración tópica, el presente compuesto se puede aplicar en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, en general será conveniente administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser sólido o líquido.

45 Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxiaquilos o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en que el presente compuesto se puede disolver o dispersar en niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Los adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales se pueden añadir para optimizar las propiedades para un uso determinado. Las composiciones líquidas resultantes se
50 pueden aplicar en parches absorbentes, usados para impregnar vendas y otros apósitos o rociar sobre el área afectada mediante el uso de rociadores tipo bomba o aerosol.

También se pueden emplear espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácido graso, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con portadores líquidos para formar pastas untables, geles, ungüentos, jabones y similares, para la aplicación directa en la piel del usuario.

55 Los ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que se pueden usar para administrar el compuesto en la piel son conocidas en la técnica; por ejemplo, ver Jacquet et al. (Patente U.S. Núm. 4.608.392), Geria (Patente U.S. Núm. 4.992.478), Smith et al. (Patente U.S. Núm. 4.559.157) y Wortzman (Patente U.S. Núm. 4.820.508).

Las dosis útiles para el compuesto de la invención se pueden determinar por la comparación de su actividad in vitro, y

actividad in vivo en los modelos animales. Los procedimientos para la extrapolación de dosis efectivas en ratones, y otros, a seres humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, ver Patente U.S. Núm. 4.938.949.

5 Generalmente, la concentración de los compuestos en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente 0,1-25% en peso, preferentemente de aproximadamente 0,5-10% en peso. La concentración de una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente 0,1-5% en peso, preferentemente aproximadamente 0,5-2,5% en peso.

10 La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado de esta, necesaria para usar en el tratamiento variará no solo con la sal particular seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se trata y la edad y condición del paciente y finalmente será según el criterio del médico o clínico asistente. Asimismo la dosificación del compuesto varía de acuerdo con la célula, tumor, tejido, injerto u órgano.

La dosis deseada se puede presentar de modo conveniente en una dosis única o como dosis divididas administradas en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más sub-dosis por día. La sub-dosis misma también se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en numerosas administraciones diferenciadas espaciadas libremente; tal como inhalaciones múltiples de un insuflador o por aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

15 Un régimen de administración puede incluir tratamiento diario a largo plazo. Por "largo plazo" se entiende al menos dos semanas y preferentemente, varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este rango deseado pueden ser determinadas por los expertos en la técnica mediante solo experimentación de rutina dadas las enseñanzas de la presente. Ver Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosis también puede ser ajustada por el médico en forma individual en el caso de alguna complicación.

20 La invención proporciona un agente que es un modulador de las interacciones TNF-alfa/receptor de TNF-alfa.

El agente candidato puede ser un agente sintético, o una mezcla de agentes o puede ser un producto natural (por ejemplo, un extracto de planta o un sobrenadante de cultivo). Un agente candidato de acuerdo con la invención incluye una pequeña molécula que se puede sintetizar, un extracto natural, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.

25 Se pueden seleccionar agentes moduladores candidatos de bibliotecas grandes de agentes sintéticos o naturales. Actualmente se usan numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de los agentes basados en sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos. Las bibliotecas del agente sintético están disponibles en el comercio en numerosas compañías que incluyen Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), y Microsource (New Milford, CT). Una biblioteca química rara está disponible en Aldrich (Milwaukee, WI). Las bibliotecas combinatorias están disponibles y se pueden preparar. Alternativamente, las bibliotecas de agentes naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles en por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o se pueden producir fácilmente por los procedimientos bien conocidos en la técnica. En forma adicional, las bibliotecas y agentes naturales y producidos sintéticamente se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

35 Se pueden hallar agentes útiles en numerosas clases químicas. Los agentes útiles pueden ser agentes orgánicos, o agentes orgánicos pequeños. Los agentes orgánicos pequeños tienen un peso molecular de más de 50, aún menos de aproximadamente 2.500 dalton, preferentemente menos de aproximadamente 750, más preferentemente menos de aproximadamente 350 dalton. Las clases de ejemplos incluyen heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides, y similares. Los agentes se pueden modificar para aumentar la eficacia, estabilidad, compatibilidad farmacéutica, y similares. La identificación estructural de un agente se puede usar para identificar, generar o analizar agentes adicionales. Por ejemplo, cuando se identifican agentes peptídicos, se pueden modificar de una variedad de maneras para aumentar su estabilidad, tal como el uso de aminoácido no natural, tal como un D-aminoácido, particularmente D-alanina, por la funcionalización del extremo terminal amino o carboxílico, por ejemplo para el grupo amino, acilación o alquilación, y para el grupo carboxilo, esterificación o amidificación, o similares.

45 Para la detección primaria, una concentración útil de un agente candidato de acuerdo con la invención es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 μ M o ~~ns~~ (es decir 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M etc.). La concentración de análisis primaria se usará como un límite superior, junto con nueve concentraciones adicionales, en que se determinan las concentraciones adicionales por la reducción de la concentración de análisis primario en intervalos semilog (por ejemplo, para 9 concentraciones más) para las pruebas secundarias o para generar las curvas de concentración.

50 Un kit de detección de alto rendimiento de acuerdo con la invención comprende todos los medios necesarios y medios para realizar la detección de un agente que modula las interacciones de TNF-alfa/receptor de TNF-alfa por la interacción con TNF-alfa en presencia de un polipéptido, preferentemente a una concentración en el rango de 1μ M a 1 M.

55 El kit comprende lo siguiente. Las células recombinantes de la invención, que comprende y expresa la secuencia de nucleótidos que codifica TNF-alfa, que se cultivan de acuerdo con el kit sobre un soporte sólido, tal como una placa de microtitulación, más preferentemente una placa de microtitulación de 96 pocillos, de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica en especial como se describe en el documento WO 00/02045. Alternativamente se suministra TNF-alfa en una forma purificada para ser inmovilizada sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de

96 pocillos por los expertos en la técnica. Alternativamente se suministra TNF-alfa en el kit pre-inmovilizado sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos. The TNF-alfa puede el TNF-alfa completo o un fragmento de este.

5 Los agentes moduladores de acuerdo con la invención, a concentraciones de aproximadamente $1\mu\text{M}$ a 1 mM o más, se añaden a los pocillos definidos en presencia de una concentración apropiada del polipéptido anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga de este, una porción funcional de este o una porción funcional de una secuencia homóloga de este, dicha concentración de dicho polipéptido preferentemente en el rango de $1\mu\text{M}$ a 1 mM . Los kits pueden contener uno o más polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención.

10 Los ensayos de unión se realizan de acuerdo con los procedimientos ya desvelados en la presente y los resultados se compran con el nivel basal de por ejemplo TNF-alfa de unión a un polipéptido anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga de este, una porción funcional de este o una porción funcional de una secuencia homóloga de este, pero en ausencia de agente modulador agente añadido. Los pocillos que muestran al menos 2 veces, preferentemente 5 veces, más preferentemente 10 veces y con máxima preferencia a 100 veces o más aumento o disminución de la unión al polipéptido de TNF-alfa (por ejemplo) en comparación con el nivel de actividad en ausencia de modulador, se seleccionan para el análisis adicional.

15 La invención proporciona otros kit útiles para analizar para moduladores de la unión del TNF-alfa- receptor de TNF-alfa, así como kits útiles para el diagnóstico de los trastornos caracterizados por la disfunción de TNF-alfa. La invención también proporciona kits útiles para analizar moduladores de los trastornos así como kits para su diagnóstico, dichos trastornos caracterizados por uno o más procesos que involucran TNF-alfa. Los kits útiles de acuerdo con la invención pueden incluir un TNF-alfa aislado. Alternativamente, o además, un kit puede comprender células transformadas para
20 expresar TNF-alfa. En una realización adicional, un kit de acuerdo con la invención puede comprender un polinucleótido que codifica TNF-alfa. En otra realización adicional, un kit de acuerdo con la invención puede comprender los cebadores específicos para la amplificación de TNF-alfa. Los kits útiles de acuerdo con la invención pueden comprender un polipéptido TNF-alfa aislado, un homólogo a este, o una porción funcional de este. Un kit de acuerdo con la invención puede comprender las células transformadas para expresar dicho polipéptido. Los kits pueden contener más de un
25 polipéptido. En una realización adicional, un kit de acuerdo con la invención puede comprender un polinucleótido que codifica TNF-alfa. En una realización aún adicional, un kit de acuerdo con la invención puede comprender los cebadores específicos útiles para la amplificación de una macromolécula tal como, por ejemplo, TNF-alfa. Todos los kits de acuerdo con la invención comprenderán los artículos o combinaciones de artículos indicados y materiales de envase. Los kits también incluirán instrucciones para el uso.

30 La invención se describirá a continuación por medio de los siguiente ejemplos y figuras no limitantes, en que las Figuras muestran:

Nanocuerpos TNF- α monovalentes

Figura 1: Alineamiento de secuencias de nanocuerpos TNF- α humanos

Figura 2: Alineamiento de secuencias de nanocuerpos TNF- α específicos para albúmina sérica

35 Figura 3: Unión de nanocuerpos TNF- α específicos para albúmina sérica a albúmina sérica humana

Figura 4: Unión de nanocuerpos TNF- α específicos para albúmina sérica a albúmina sérica de rhesus

Figura 5: Unión de nanocuerpos TNF- α específicos para albúmina sérica a albúmina sérica de ratón

Figura 6: Pureza de TNF- α y nanocuerpos de albúmina sérica (SDS-PAGE)

Figura 7: Análisis de transferencia Western de TNF- α y nanocuerpos de albúmina sérica

40 Figura 8: Unión de nanocuerpos de TNF- α a TNF- α humano (ELISA)

Figura 9: Unión de nanocuerpos de TNF- α a TNF- α de rhesus (ELISA)

Figura 10: Ensayo de inhibición del receptor sobre Enbrel TNF- α humano

Figura 11: Ensayo de inhibición del receptor sobre Enbrel TNF- α de rhesus

Figura 12: Unión de de nanocuerpos de TNF- α a TNF- α humano TNFo (Biacore)

45 Figura 13: Unión de nanocuerpos de TNF- α a TNF- α de rhesus (Biacore)

Figura 14: Unión de nanocuerpos de TNF- α a la Proteína A (Biacore)

Figura 15: Tratamiento de temperatura de TNF- α y nanocuerpos de albúmina sérica (transferencia de Western)

Figura 16: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- α (ELISA)

Figura 17: Tratamiento de temperatura de nanocuerpos de albúmina sérica (Biacore)

Nanocuerpos de TNF- α bivalentes

Figura 18: Pureza de nanocuerpos de TNF- α bivalentes (SDS-PAGE)

Figura 19: Análisis de transferencia Western de nanocuerpos de TNF- α bivalentes

5 Figura 20: Ensayo de inhibición del receptor sobre Enbrel para nanocuerpos de TNF- α bivalentes

Figura 21: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- α bivalentes (ELISA)

Nanocuerpos de TNF- α monovalentes humanizados

Figura 22: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados TNF1, que son nanocuerpos de acuerdo con la invención

10 Figura 23: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados TNF2.

Figura 24: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados TNF3

Figura 25: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados ALB1

Figura 26: Pureza de TNF- α humanizado y nanocuerpos de albúmina sérica (SDS-PAGE)

Figura 27: Análisis de transferencia Western de TNF- α humanizado y nanocuerpos de albúmina sérica

15 Figura 28: Unión de nanocuerpos TNF- α humanizados a TNF- α humano

Figura 29: Unión de nanocuerpos de albúmina sérica humanizada a albúmina sérica humana

Figura 30: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos TNF- α humanizados (ELISA)

Nanocuerpos TNF- α trivalentes

Figura 31: Pureza de nanocuerpos de TNF- α trivalentes (SDS-PAGE)

20 Figura 32: Análisis de transferencia Western de nanocuerpos de TNF- α trivalentes

Figura 33: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- α trivalentes

Nanocuerpos de TNF- α monovalentes humanizados (segunda ronda)

Figura 34: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados TNF1, que son nanocuerpos de acuerdo con la invención

25 Figura 35: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados TNF2

Figura 36: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados TNF3

Figura 37: Alineamiento de secuencias múltiple de nanocuerpos humanizados ALB1

Figura 38: Pureza de nanocuerpos TNF- α humanizados (SDS-PAGE)

Figura 39: Análisis de transferencia Western de nanocuerpos TNF- α humanizados

30 Figura 40: Unión de nanocuerpos TNF- α humanizados a TNF- α humano

Figura 41: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos TNF- α humanizados (ELISA)

Figura 42: Análisis de TNF60 purificado en gel de SDS-PAGE teñido con plata (A) y gel SDS-PAGE teñido con Coomassie (B) y en el análisis de transferencia western usando anti-NB (C) para la detección

Figura 43: Cromatograma de exclusión por tamaño analítico de TNF60 en Superdex HR75

35 Figura 44: Unión de TNF60 a TNF-alfa humano

Figura 45: Curva de dosis respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF-alfa humano usando NanocuerpoTM TNF60 en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimumab) y Remicade (Infliximab)

Figura 46: Curva de dosis respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF- α de rhesus using NanobodyTM TNF60 en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimumab) y Remicade (Infliximab)

- Figura 47: Perfil farmacocinético de TNF60 en ratones
- Figura 48: Perfil de inmunogenicidad de TNF60 en ratones
- Figura 49: Análisis de TNF56-PEG40, TNF56-PEG60, TNF56-biotina, TNF55-PEG40, TNF55-PEG60 y TNF55-biotina purificados en gel SDS-PAGE teñido con Coomassie
- 5 Figura 50: Análisis de TNF56-PEG40 purificado en gel de SDS-PAGE con tinción de plata (A) tinción Coomassie (B) y análisis de transferencia Western usando anti-NB (C) para detección
- Figura 51: Cromatograma de exclusión por tamaño analítico de TNF56-PEG40 en Superdex HR 75
- Figura 52: Cromatograma de exclusión por tamaño analítico de TNF56-PEG40 en Superdex HR 200
- 10 Figura 53: Curva de dosis respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF- α humano usando NanobodyTM TNF56-PEG40 y el NanobodyTM TNF1 tipo salvaje monovalente en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimumab) y Remicade (Infliximab)
- Figura 54: Curva de dosis respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF- α de rhesus usando NanobodyTM TNF56-PEG40 en comparación con Enbrel (Etanercept), Humira (Adalimumab) y Remicade (Infliximab)
- 15 Figura 55: Análisis farmacocinético de NanobodyTM TNF56-PEG40 y TNF56-PEG60 pegilado bivalente después de la administración intravenosa en los ratones
- Figura 56: Análisis farmacocinético de NanobodyTM 3E-3E-PEG20 pegilado bivalente, NanobodyTM 3E-3E-PEG40 pegilado bivalente y NanobodyTM 3E-3E-AR1 biespecífico después de la administración intravenosa en los ratones
- Figura 57: Perfil de inmunogenicidad de TNF56-PEG40 y TNF56-PEG60 en los ratones
- Figura 58: Eficacia de TNF60 en la prevención de poliartritis crónica en los ratones
- 20 Figura 59: Eficacia de TNF60 en el tratamiento terapéutico de la poliartritis crónica en los ratones
- Figura 60: Efecto del formateo de TNF60 NanobodyTM sobre la eficacia en la prevención de poliartritis crónica en los ratones
- Figura 61: Alineamiento de secuencias de NanocuerposTM PMP1C2, 3E, 1A y 3G
- Figura 62: Modelo molecular de TNF-60
- 25 Las tablas anexas forman una parte integrante de la presente memoria descriptiva y son las siguientes:
- Nanocuerpos TNF- α monovalentes
- Tabla 8; Listado de secuencias de los nanocuerpos TNF- α
- Tabla 9: Valores de K_{off} de los nanocuerpos TNF- α humanos
- Tabla 10: Homología de TNF- α y nanocuerpos de albúmina sérica para las secuencias de línea germinal humana
- 30 Tabla 11: Niveles de expresión de TNF- α y nanocuerpos de albúmina sérica
- Tabla 12: ELISA de unión a TNF- α humano y rhesus
- Tabla 13: Ensayo de inhibición del receptor de los nanocuerpos TNF- α
- Tabla 14: Análisis Biacore de los nanocuerpos TNF- α
- Tabla 15: Unión de nanocuerpos TNF- α a TNF- α (valores de K_D)
- 35 Tabla 16: Potencia de los nanocuerpos de TNF- α para neutralizar TNF- α humano (a) y rhesus (b)
- Tabla 17: DO 280 nm de TNF- α y nanocuerpos de albúmina sérica después del tratamiento de temperatura
- Tabla 18: Potencia de nanocuerpos de TNF- α después del tratamiento de temperatura
- Nanocuerpos de TNF- α bivalentes
- Tabla 19: Listado de secuencias de nanocuerpos de TNF- α bivalentes y secuencias ligadoras
- 40 Tabla 20: Constructos del nanocuerpo TNF- α bivalentes

Tabla 21: Niveles de expresión de nanocuerpos de TNF- α bivalentes

Tabla 22: Ensayo de inhibición del receptor de nanocuerpos de TNF- α bivalentes

Tabla 23: Potencia de nanocuerpos TNF- α para neutralizar TNF- α humano (a) y rhesus (b)

Tabla 24: DO 280 nm de nanocuerpos de TNF- α bivalentes

5 Nanocuerpos TNF- α monovalentes humanizados

Tabla 25: Listado de secuencias de nanocuerpos de TNF- α monovalentes humanizados y albúmina sérica

Tabla 26: Niveles de expresión de nanocuerpos de TNF- α humanizados y albúmina sérica

Tabla 27: Potencia de nanocuerpos TNF- α para neutralizar TNF- α humano

Tabla 28: DO 280 nm de nanocuerpos de TNF- α humanizados y albúmina sérica

10 Nanocuerpos de TNF- α trivalentes

Tabla 29: Listado de secuencias de nanocuerpos TNF- α trivalentes

Tabla 30: Constructos de nanocuerpos TNF- α trivalentes

Tabla 31: Niveles de expresión de nanocuerpos TNF- α trivalentes

Tabla 32: Potencia de nanocuerpos TNF- α trivalentes

15 Para neutralizar TNF- α humano.

Tabla 33: Unión de nanocuerpos trivalentes a albúmina sérica (valores de K_D)

Tabla 34: DO 280 nm de nanocuerpos TNF- α trivalentes

Nanocuerpos TNF- α monovalentes humanizados (segunda ronda)

Tabla 35: Listado de secuencias de nanocuerpos TNF- α monovalentes humanizados de segunda ronda

20 Tabla 36: Niveles de expresión de nanocuerpos TNF- α humanizados

Tabla 37: Potencia de nanocuerpos de TNF- α para neutralizar TNF- α humano

Tabla 38: DO 280 nm de nanocuerpos TNF- α humanizados

Tabla 39: Comparación de bioactividad de los nanocuerpos

Tablas adicionales

25 Tabla 40: Panorama general de oligonucleótidos usados en el formateado de NanocuerposTM trivalentes

Tabla 41: Panorama general de oligonucleótidos usados en la clonación de NanocuerposTM trivalentes

Tabla 42: Valores de EC50 obtenidos en el ensayo de citotoxicidad usando NanocuerposTM trivalentes TNF60 en comparación con los controles comerciales (Enbrel, Remicade, Humira)

Tabla 43: Determinación de afinidad de TNF64 y TNF24 sobre albúmina sérica humana en Biacore.

30 ND, no determinado.

Tabla 44: Panorama general de oligonucleótidos usados en el formateado de NanobodiesTM bivalentes

Tabla 45: Valores de EC50 obtenidos en el ensayo de citotoxicidad usando NanobodiesTM bivalentes en comparación con los controles comerciales (Enbrel, Remicade, Humira)

Tabla 46: Resultados de los estudios de fibroblastos derivados sinoviales

35 Tabla 47: Resultados de los estudios de bolsa de aire murinos

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de nanocuerpos específicos para TNF- α y albúmina sérica

Los nanocuerpos antagonistas se identificaron mediante dos llamas (Llama glama) inmunizadas con TNF- α humano con 6 inyecciones de 100 μ g de la citoquina en intervalos semanales. La detección se realizó mediante un ensayo basado en competición, en que se analizaron los nanocuerpos individuales en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de TNF- α marcado a su receptor. Los nanocuerpos específicos de albúmina se identificaron en una llama inmunizada con albúmina sérica humana. La detección de los los nanocuerpos individuales se realizó por ELISA usando albúmina humana,

rhesus y de ratón, que produce un panel de nanocuerpos que reaccionan en forma cruzada con la albúmina sérica de varias especies.

Ejemplo 2: Análisis de secuencia de nanocuerpos aislados

Se identificaron diferentes clases de nanocuerpos sobre la base del análisis de secuencia (Figura 1) por medio de una matriz de puntuación BLOSUM62 y valor límite de significancia de semejanza de $\geq 60\%$;

Clase I (PMP1 C2, PMP1 G11, PMP1 H6), Clase II (PMP1 G5, PMP1 H2, PMP3 G2), Clase IIb (PMP1 D2), Clase III (PMP3 D10, PMP5 F10). La Tabla 8 lista las secuencias de estos nanocuerpos de TNF- α (SEQ ID NOs: 52 a 60).

Sobre la base del análisis de secuencia (Figura 2) se identificaron diferente clases de nanocuerpos de albúmina sérica por medio de una matriz de puntuación BLOSUM62 y un valor límite de significancia de semejanza de $\geq 60\%$. La Tabla 8 lista las secuencias de estos nanocuerpos de albúmina sérica (SEQ ID NOs: 61 a 67).

Ejemplo 3: Análisis Biacore

TNF- α

Unión de nanocuerpos a TNF- α se caracterizó por resonancia del plasmón superficial en un instrumento Biacore 3000, El TNF de diferentes especies se unió en forma covalente a la superficie de los chips sensores CM5 por medio del acoplamiento de amina hasta que se alcanzó un aumento de 250 unidades de respuesta. Los grupos reactivos restantes se inactivaron. Se evaluó la unión del nanocuerpo a una concentración (diluido 1 en 1.000). Cada nanocuerpo se inyectó durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45 μ l/min para permitir la unión al antígeno unido al chip. La solución tampón de unión sin nanocuerpo se envió sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación espontánea del nanocuerpo unido durante 4 horas. Los valores K_{off} se calcularon a partir de los sensogramas obtenidos para los diferentes nanocuerpos.

De cada clase de nanocuerpos, se analizaron las proteínas no purificadas en el Biacore. Los datos de K_{off} se listan en la Tabla 9.

Los nanocuerpos representativos de cada clase se retuvieron para el análisis posterior sobre la base del valor de K_{off} . Para la Clase I, se seleccionó PMP1C2 (TNF1); PAMPIG5 (TNF2) se seleccionó como representante de la Clase II; PMP5F10 (TNF3) se seleccionó como representante de la Clase III.

Albúmina sérica

La unión se analizó como se describió anteriormente excepto que se usó una dilución de 1 en 20. Las Figuras 3, 4 y 5 ilustran el análisis de los nanocuerpos TNF- α específicos de albúmina versus albúmina sérica humana, rhesus y de ratón mediante el uso de proteína no purificada.

Los anticuerpos se clasificaron de acuerdo con los valores de K_{off} , de la siguiente Tabla:

Clase	humana	Rhesus	ratón
C	PMP6A8	PMP6A8	PMP6B4
C	PMP6B4	PMP6B4	PMP6A8
B	PMP6A6	PMP6A6	PMP6A6
B	PMP6C1	PMP6C1	PMP6C1
A	PMP6G8	PMP6G8	PMP6G8
A	PMP6A5	PMP6A5	PMP6A5
D	PMP6G7	PMP6G7	PMP6G7

Los mejores K_{off} se obtuvieron para los miembros de la familia C y familia B. También se observó reactividad cruzada entre albúmina sérica humana, rhesus y de ratón para los miembros de estas familias. Un nanocuerpo representativo de clase B y C se definió para el análisis posterior: PMP6A6 (ALB1) se seleccionó como representante de Clase B y

PMP6AS (ALB2) se seleccionó como representante de Clase C.

Ejemplo 4: Clonación de nanocuerpos monovalente en pAX051 Descripción del vector de expresión de Escherichia coli

5 El pAX051 es un derivado de pUC19. Contiene el promotor LacZ que permite una inducción controlada de la expresión mediante IPTG. El vector tiene un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina. Los sitios de multiclonación albergan varios sitios de restricción de los cuales SfiI y BstII se usan con frecuencia para la clonación de Nanobodies™. En el marco con la secuencia codificadora NB el vector codifica una marca c-myc C-terminal y una marca (His)6. El péptido señal es la secuencia líder gen3 que transloca el Nanobody™ expresado en el periplasma.

10 El ADN que codifica los nanocuerpos seleccionados TNF1 (PMP1C2), TNF2 (PMP1G5), TNF3 (PMPF10), ALB1 (PMP6A6) y ALB2 (PMP6A8) se clonó en pAX051 y el constructo se transformó en las células electrocompetentes TGI. Los clones se analizaron por inserto de PCR y la secuencia de nucleótidos se determinó a partir de 4 clones positivos. Los patrones de glicerol se prepararon a partir de los clones que contienen la secuencia correcta y se conservaron a -80°C.

Ejemplo 5: Expresión de nanocuerpos monovalentes

15 Un precultivo se inició por la inoculación de una colonia única del clone que expresa los nanocuerpos respectivos a 37°C en caldo Luria, ampicilina/carbenicilina (100 µg/ml) y 2% de glucosa durante la noche. Este precultivo se usó para inocular. El inóculo es 1% por ciento (v/v) del cultivo de producción (medio TB + ampicilina/carbenicilina + 0,1% de glucosa). El cultivo de producción se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO de 600 nm de 5-10 y se induce la expresión de nanocuerpos por la adición de IPTG (1 mM de concentración final). La expresión de proteína se deja continuar durante 4 h a 37°C o durante toda la noche a 28°C, en este momento se recolectan las células por centrifugación y se conservan como pasta celular húmeda a -20°C.

20 Los extractos periplásmicos preparativos de la pasta celular húmeda conservada a -20°C se obtienen por la resuspensión del pellet en solución tampón Peri (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, pH ajustado a 8,0), se hace girar la mezcla durante 30 minutos a 4°C y se centrifuga la mezcla mediante una centrifuga preparativa (Sorvall RC-3C Plus con rotor H-6000A) para sedimentar las células. Se recolecta el sobrenadante que representa un extracto aproximado del espacio periplásmico para la purificación posterior.

25 Los nanocuerpos marcados con His(6) se purifican por cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC). La resina TALON (Clontech) se procesa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos se incuban con la resina durante 30 min a RT sobre un rotador. La resina se lava con PBS y se transfiere a una columna. La resina empaquetada se lava con 15 mM de imidazol. Los nanocuerpos se eluyen de la columna por medio de 150 mM de imidazol. Las fracciones eluidas se analizan por siembra en la membrana Hybond y visualización con Ponceau. Las fracciones que contienen proteína se mezclan y dializan contra PBS. Las proteínas dializadas se recolectan, filtran, esterilizan, se determina la concentración y se conservan en alícuotas a -20°C.

Caracterización de nanocuerpos TNF-α monovalentes

Ejemplo 6: Homología con secuencias de línea germinal humana

35 Las secuencias de aminoácidos del nanocuerpo se compararon con las secuencias de línea germinal humana como se representa en la Tabla 10. En el orden de homología con las secuencias humanas, los nanocuerpos se clasifican de la siguiente manera: TNF1 > TNF2 > TNF3 para los nanocuerpos TNF-α; ALB1 > ALB2 para los nanocuerpos de albúmina sérica.

Ejemplo 7: Nivel de expresión

40 Se calcularon los niveles de expresión y se representaron en la Tabla 11. En orden de rendimiento, los nanocuerpos se clasifican de la siguiente manera: TNF1>TNF2>TNF3 para los nanocuerpos TNF-α; ALB1 > ALB2 para los nanocuerpos de albúmina sérica.

Ejemplo 8: Análisis de SDS-PAGE

45 Para determinar la pureza, se analizaron las muestras de proteína en gel SDS-PAGE 15%. Se añadieron 10µl de solución tampón de muestra Laemmli a 10µl (1 µg) de proteína purificada, la muestra se calentó durante 10 minutos a 95°C, se enfrió y cargó en un gel SDS-PAGE 15%. El gel se procesó de acuerdo con procedimientos generales y se tiñó con azul de Coomassie Brilliant (CBB). La Figura 6

representa el SDS-PAGE para los nanocuerpo específicos de TNF-α y específicos de albúmina sérica.

Ejemplo 9: Análisis de transferencia Western

50 Se cargaron 100 ng de proteína purificada en el gel. Después del SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Biorad). La membrana se

bloqueó durante toda la noche en PBS, 1% de caseína a 4°C.

Como todos los constructos se fusionaron a la marca c-Myc, se usó el anticuerpo monoclonal anti-myc como una herramienta de detección. Además, el anti-nanocuerpo policlonal de conejo (R.23) se usó como herramienta de detección. La transferencia se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación en anticuerpo antimyc diluido 1/2000 en PBS o anticuerpo anti-nanocuerpo 1/2000 diluido en PBS, 1% de caseína. La membrana se lavó 5 veces en PBS antes de aplicar el anticuerpo secundario (conjugado de IgG de anti-ratón de conejo y fosfatasa alcalina, Sigma, A1902, diluido 1/1000 en PBS o conjugado de IgG de anti- conejo de cabra y fosfatasa alcalina, Sigma, A8025, 1% de caseína). Después de la incubación con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente, la membrana se lavó 5 veces en PBS. Las transferencias se desarrollaron usando soluciones BCIP/NBT y la reacción se detuvo por el lavado de la transferencia con agua milliQ cuando las bandas fueron claramente visibles. La Figura 7 representa el análisis de transferencia Western.

Ejemplo 10: ELISA para unión a TNF- α humano y rhesus

Se realizó un ELISA para examinar la unión a TNF- α humano y de rhesus. Una placa Maxisorp de 96 pocillos se recubrió con 2 μ g/ml de neutravidina en PBS ON a 4°C. Las placas se bloquearon con 1% de caseína durante 2 horas a R.T. Se añadió TNF- α biotinilada (400 ng/ml) a los pocillos y se incubó durante 1 hora a RT. Las muestras de nanocuerpo se diluyeron a partir de 2 μ g/ml y mediante diluciones 1 en 3. Los nanocuerpos se detectaron mediante anti-myc de ratón (diluido 1/2000) y anti-ratón de conejo y fosfatasa alcalina (diluido 1/200, Sigma, A1902) y pNPP (2 mg/ml) como sustrato. Las Figuras 9 y 10 representan la unión en el ELISA para la TNF- α humano y rhesus.

Los resultados se sintetizan en la Tabla 12. TNF1 y TNF3 muestran unión a TNF- α humano y rhesus. TNF2 se une a TNF- α humano pero es solo débilmente reactiva para TNF- α de rhesus.

Ejemplo Ensayo de inhibición del receptor

La capacidad de inhibir la interacción del receptor-ligando se analizó para TNF- α de rhesus y humana. Una placa Maxisorp de 96 pocillos se recubrió con μ g/ml de Enbrel en PBS ON a 4°C. Las placas se bloquearon con 1% de caseína durante 2 horas a R.T. Las muestras de nanocuerpo se pre-incubaron durante 30 min a RT con TNF- α biotinilada (10 ng/ml) a partir de una concentración de 5 μ g/ml y mediante diluciones 1 en 2. Las muestras se añadieron a las placas y se incubaron durante 1 hora a RT. La TNF- α biotinilada se detectó mediante fosfatasa alcalina Extravidina (diluido 1/2000) y pNPP (2 mg/ml) como sustrato. Las Figuras 11 y 12 representan una inhibición ELISA para TNF- α humano y rhesus. Los resultados se sintetizan en la Tabla 13. Se observa la inhibición de la unión ligando/receptor unión para TNF1 y TNF3 para el TNF humano y ratón, mientras que TNF2 es TNF- α humano.

Ejemplo 12: Análisis Biacore

Unión de TNF- α

El análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Las Figuras 13 y 14 ilustran la unión a TNF- α humano y rhesus por medio del análisis Biacore. Los resultados se sintetizan en la Tabla 14. Los experimentos de unión en el Biacore confirman los resultados de ELISA: unión con reacción cruzada para TNF1 y TNF3, mientras que TNF2 solo se une significativamente a TNF- α humano.

Albúmina sérica

La unión se analizó como se describió anteriormente excepto que se usaron series de concentraciones diferentes. Cada concentración se inyectó durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45 μ l/min para permitir la unión al antígeno unido al chip. La solución tampón de unión sin analito se envió sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación del nanocuerpo unido. Después de 15 minutos, se extrajo el analito unido restante por la inyección de la solución de regeneración (25 mM de NaOH).

A partir de los sensorgramas obtenidos para las diferentes concentraciones de cada analito, se calcularon los valores de K_D por medio de la afinidad en estado estacionario cuando se alcanzó el equilibrio.

Los resultados se sintetizan en la Tabla 15. Se observa reactividad cruzada para ALB1 y ALB2. La afinidad más alta se observa para ALB2 en TNF- α humano y rhesus. Sin embargo, la diferencia de afinidad para humano/rhesus versus albúmina sérica de ratón es más pronunciada para ALB2 (factor 400), mientras que para ALB1 se observa una diferencia de un factor 12.

Ejemplo 13: Bioensayo

Se usó la línea celular L929 de fibroblastos de ratón sensibles a TNF- α para medir la actividad anti-TNF- α de los nanocuerpos seleccionados. A una concentración suficientemente alta de TNF- α en el medio, es decir, dosis citotóxica, las células L929 experimentan necrosis. La inhibición de interacción TNF- α con su receptor se deterró por la preincubación una serie de diluciones de anticuerpo con concentración citotóxica de TNF- α antes de añadir la mezcla a las células. La presencia de actinomicina D en el medio sensibiliza las células adicionalmente para TNF- α , lo que produce aumento de la sensibilidad del bioensayo para TNF- α libre.

Las células L929 se cultivaron hasta casi confluencia, se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a razón de 5000 células por pocillo y se incubaron durante toda la noche. Se añadió actinomicina D a las células a una concentración final de $\mu\text{g/ml}$. Las diluciones seriadas de los nanocuerpos para analizar se mezclaron con una concentración citotóxica de TNF- α (la concentración de ensayo final es 0,5 ng/ml o 15 UI/ml). Después de al menos 30 minutos de incubación a 37°C, esta mezcla se añadió a las células sembradas. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se determinó la viabilidad celular por el uso de la sal de tetrazolio WST-1. Se calcularon las curvas de dosis-respuesta y los valores de EC₅₀ con Graphpad Prism.

Los resultados se sintetizan en la Tabla 16 para TNF- α humano y rhesus. Sobre la base de su potencia para neutralizar la actividad citotóxica, las moléculas se clasifican de la siguiente manera: TNF3>TNF1>TNF2 para TNF- α humano, y TNF1 = TNF3 > TNF2 para TNF- α de rhesus.

30 Ejemplo 14: Unión de Proteína A

La Figura 14 representa la unión de Proteína A analizada en Biacore como se describe en el Ejemplo 12. Se obtuvo unión positiva para TNF1, TNF2, ALB1. Se observó unión débil o ninguno para TNF3 y ALB2.

Ejemplo 15: Estabilidad de temperatura

Las muestras se diluyeron a 200 $\mu\text{g/ml}$ y se dividieron en 6 vials que contiene 500 μ . Los diferentes viales se incubaron a una temperatura determinada que varía de RT a 90°C. Después del tratamiento las muestras se enfriaron durante 2 horas a RT, y se mantuvieron a 4°C. Los precipitados se eliminaron por centrifugación durante 30 min a 14.000 rpm. El SN se extrajo con cuidado y se analizó posteriormente.

DO 280 nm

Se midió la DO a 280 nm y se calculó la concentración. Los resultados se sintetizan en la Tabla 17. Se observó una disminución del contenido de proteína para TNF2 y TNF3 a partir de 80°C, mientras que para ALB2 se observa a partir de 70°C.

Transferencia Western

Se separaron 2 μg de proteína tratada en 15% de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se trató como se describió anteriormente. Se realizó la detección usando anti-nanocuerpo policlonal (R23, diluido 1/2000) y peroxidasa de rábano anti-conejo de caballo (DAKO, P0448, diluido 1/2000). La Figura 15 representa el análisis de transferencia Western. Se observó un claro descenso de la concentración de proteína para ALB2 tratado a 70, 80 y 90°C. Todavía se observó agregación para TNF1 tratado a 70, 80 y 90°C; para TNF3 tratado a 90°C; para ALB1 tratado a 90°C, lo que significa que el SN aún contiene trazas de precipitados que producen una lectura a DO 280 nm más alta. Esto explica por qué la concentración de proteína medida a DO 280 nm no disminuye para TNF1, TNF3 y ALB1 tratados a estas T más altas.

ELISA

El ELISA para detectar la unión a TNF- α humana se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 10. Los resultados se presentan en la Figura 16. La unión al TNF- α humano disminuye para TNF1, TNF2, TNF3 a partir de 80°C.

Bioensayo

El bioensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados se sintetizan en la Tabla 18. La potencia de los nanocuerpos está disminuida para TNF1 a partir de 70°C; para TNF2 y TNF3 a partir de 80°C.

Biacore

La unión a albúmina sérica humana se determinó como se describe en el Ejemplo 12. Se usó una concentración fija (dilución 1 en 50). Los resultados se presentan en la Figura 17. El tratamiento de temperatura no está influyendo en la unión a la albúmina sérica para ALB1. El tratamiento tiene efecto sobre la K_{on} para ALB2 a partir de T= 70°C.

Nanocuerpos bivalentes

Ejemplo 16: Formateado de nanocuerpos específicos de TNF- α bivalentes

Se formatearon TNF1, TNF2 y TNF3 a nanocuerpos bivalentes. Como espaciador entre los dos bloques de construcción se usó un ligador 9AA GlySer (Tabla 19 SEQ ID No: 68) o un ligador 30 AA GlySer (Tabla 19 SEQ ID No: 69). Esto generó los constructos representados por la Tabla 20. La Tabla 19 lista las secuencias de estos nanocuerpos específicos de TNF- α bivalentes (SEQ 117 NOs: 70 a 75).

Ejemplo 17: Expresión de nanocuerpos específicos de TNF- α bivalentes

La expresión se realizó como se describe en el Ejemplo 5. Los nanocuerpos marcados con His(6) se purificaron por

5 purifican cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC). La resina Ni-NTA (Qiagen) se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos se incubaron con la resina durante 30 min a RT sobre un rotador. La resina se lavó con PBS y se transfirió a una columna. La resina empaquetada se lavó con PBS (diluido 1 en 10). Los nanocuerpos se eluyeron de la columna por medio de 25 nM de Imidazol. Las fracciones aclaradas se analizaron por siembra en la membrana Hybond y visualización con Ponceau. Las fracciones que contienen proteína se mezclaron y se purificaron adicionalmente por intercambio catiónico seguido por exclusión por tamaño. Las proteínas purificadas se recolectaron, filtraron, esterilizaron, se determinó la concentración y se conservaron en alícuotas a -20°C.

Caracterización de nanocuerpos específicos de TNF- α bivalentes

Ejemplo 18: Nivel de expresión

10 Los niveles de expresión de los nanocuerpos de TNF- α bivalentes se calcularon y representaron en la Tabla 21. El ligador no tiene efecto significativo sobre el nivel de expresión de los Nanocuerpos.

Ejemplo 19: SDS-PAGE

Se realizó SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 18 muestra el resultado del SDS-PAGE.

Ejemplo 20: transferencia Western

15 El análisis de transferencia Western se realizó como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 19 representa los resultados de la transferencia Western.

Ejemplo 21: Ensayo de inhibición del receptor

20 El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 11. Figura 20 y la Tabla 22 representa los resultados. La mejora de la inhibición de unión de ligando/receptor se observó para todos los nanocuerpos bivalentes en comparación con el formato monovalente.

Ejemplo 22: Bioensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados se sintetizan en la Tabla 23. Sobre la base de potencia para neutralizar la actividad citotóxica, TNF8, TNF7, TNF9 y TNF5 tienen una potencia en el rango de Enbrel.

Ejemplo 23: Estabilidad a la temperatura

25 Las muestras se analizaron como se describió en el Ejemplo 15.

DO a 280 nm

Se midió la DO a 280 nm y se calculó la concentración. Los resultados se sintetizan en la Tabla 24. Se observó una disminución en el contenido de proteína para TNF4 y TNF7 a partir de 70°C, mientras que para TNF5, TNF6, TNF7, TNF8 y TNF9 se observó una disminución a partir de 80°C.

30 Transferencia Western

Las muestras se analizaron para determinar la presencia de agregados como se describió en el Ejemplo 15.

ELISA

35 El ELISA para detectar la unión a TNF- α humano se realizó esencialmente como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 21. La unión a TNF- α humano disminuyó para TNF5, TNF6, TNF8 y TNF9 a partir de 80°C, para TNF4 y TNF7 a partir de 70°C.

Nanocuerpos monovalentes humanizados

Ejemplo 24: Identificación de posiciones de aminoácidos hno humanos en los nanocuerpos específicos de TNF- α y albúmina sérica

40 La Figura 22 (TNF1), Figura 23 (TNF2), Figura 24 (TNF3) y Figura 25 (ALB1) representan alineamientos de secuencias múltiples (Clustal W 1.7) con las secuencias de DP51, DP53, DP54 y DP29.

Además de las mutaciones de aminoácido, se realizó la optimización de codón que produce las secuencias de la Tabla 25 SEQ ID NOs: 76 a 89 (Nanocuerpos contra TNF- α y albúmina sérica humana, respectivamente).

Ejemplo 25: Generación de mutantes optimizadas por codón

Se sintetizaron oligonucleótidos que abarcan la secuencia completa de los nanocuerpos.

45

Ejemplo 26: Expresión de nanocuerpos específicos de TNF- α bivalentes

La expresión se realizó como se describe en el Ejemplo 5.

Caracterización del nanocuerpo humanizado

Ejemplo 27: Nivel de expresión

- 5 La Tabla 26 representa los niveles de expresión calculados. La expresión se obtuvo con rendimientos en el rango de 3,5-11,7 mg/ml. El tiempo de inducción no influyó en el rendimiento.

Ejemplo 28: SDS-PAGE

Se realizó SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 26 representa el gel SDS-PAGE.

Ejemplo 29: Transferencia Western

- 10 El análisis de transferencia Western se realizó como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 27 representa los resultados de la transferencia Western.

Ejemplo 30: Bioensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados de los nanocuerpos humanizados se sintetizan en la Tabla 27. Los nanocuerpos de tipo salvaje se incluyen como referencia.

- 15 Ejemplo 31: Biacore

El análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 12. Figura 28 y 31 muestra los resultados de Biacore.

Ejemplo 32: Estabilidad a la temperatura

Las muestras se analizaron como se describió en el Ejemplo

DO a 280 nm

- 20 Se midió la DO a 280 y se calculó la concentración. Los resultados se sintetizan en la Tabla 28.

No se observa disminución significativa de la concentración de proteína para los nanocuerpos TNF1 (TNF13-14). Se observa una disminución de la concentración de proteína para los TNF2 (TNF15-19) y TNF3 (TNF20-23) humanizados a partir de 80°C. Se observa una disminución de la concentración de proteína para ALB1 (ALB4-5) a partir de 70°C y para ALB3 a partir de 60°C.

- 25 Transferencia Western

Las muestras se analizaron para determinar la presencia de agregados como se describió en el Ejemplo 15.

ELISA.

El ELISA para detectar la unión a TNF- α humano se realizó esencialmente como se describió en el Ejemplo 15. Los resultados se presentan en la Figura 30.

- 30 La unión de TNF- α es comparable para WT TNF1 tratado por temperatura y TNF 13 y 14 humanizados; para WT TNF2 tratado por temperatura y TNF 15-19 humanizado;

La unión de TNF- α humano está disminuida para TNF21 y 22, y en menor medida para TNF23, mientras que no se observa efecto para TNF20 en comparación con WT TNF3.

Nanocuerpos TNF- α trivalentes

- 35 Ejemplo 33: Formateado de nanocuerpos específicos de TNF- α

Trivalentes

Se formatearon TNF1, TNF2, TNF3 y ALB1 a nanocuerpos trivalentes. Como espaciador entre 2 bloques de construcción se usó un ligador 9AA GlySer (Tabla 19 SEQ ID No 68) o un ligador 30 AA GlySer (Tabla 19 SEQ ID No 69). Esto generó los constructos de Tabla 30.

- 40 La Tabla 29 lista las secuencias de nanocuerpos específicos de TNF- α trivalentes (SEQ ID NOs: 91 a 94).

Ejemplo 34: Expresión de nanocuerpos específicos de TNF- α

trivalentes

5 La expresión se realizó como se describe en el Ejemplo 5, por cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC). La resina Ni-NTA (Qiagen) se procesa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos se incuban con la resina y se incuban durante 30 min a RT sobre un rotador. La resina se lava con PBS y se transfiere a una columna. La resina empaquetada se lava con PBS (diluido 1 en 10). Se preeluye con 15 mM de imidazol. Los nanocuerpos se eluyen de la columna por medio de 25 mM de ácido cítrico pH=4. Las fracciones eluidas se analizan por siembra en la membrana Hybond y visualización con Ponceau. Las fracciones que contienen proteína se mezclan y se purifican posteriormente por intercambio catiónico seguido por exclusión por tamaño. Las proteínas purificadas se recolectan, filtran, esterilizan, se determina la concentración y se conservan en alícuotas a -20°C.

10 Caracterización de nanocuerpos específicos de TNF- α

trivalentes

Ejemplo 35: Nivel de expresión

Los niveles de expresión se calcularon y representaron en la Tabla 31.

15 Ejemplo 36: Análisis SDS-PAGE

Se realizó SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 31 representa el gel SDS-PAGE.

Ejemplo 37: Análisis de transferencia Western

El análisis de transferencia Western se realizó como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 32 representa el análisis de transferencia Western.

20 Ejemplo 38: Bioensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13.

Los resultados de los nanocuerpos bivalentes se sintetizan en la Tabla 32. Sobre la base de su potencia para neutralizar la actividad citotóxica, las moléculas son igualmente potentes y comparables en su potencia como las moléculas bivalentes.

25 5 Ejemplo 34: Unión a albúmina sérica humana

30 La unión se analizó como se describió anteriormente excepto que se usaron series de concentraciones diferentes. Cada concentración se inyectó durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45 μ l/min para permitir la unión al antígeno unido al chip. Después, la solución tampón de unión sin analito se envió sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación del nanocuerpo unido. Después de 15 minutos, se extrajo el analito unido restante por la inyección de la solución de regeneración (25 mM de NaOH).

A partir de los sensorgramas obtenidos para las diferentes concentraciones de cada analito, se calcularon los valores de K_D por medio de la afinidad en estado estacionario cuando se alcanzó el equilibrio.

Los resultados se sintetizan en la Tabla 33. Se observó una disminución de afinidad para el agente de unión ALB1 formateado en comparación con el ALB1 tipo salvaje. La afinidad sin embargo está aún en el rango de 7,2-1,4 nM.

35 Ejemplo 40: Estabilidad a la temperatura

Las muestras se analizaron como se describió en el Ejemplo 15.

DO a 280 nm.

40 Se midió la DO a 280 nm y se calculó la concentración. Los resultados se sintetizan en la Tabla 34. Se observa una disminución del contenido de proteína para TNF24, TNF27 y TNF28 a partir de 60°C, mientras que para TNF25 y TNF26 a partir de 70°C.

Transferencia Western

Las muestras se analizaron para determinar la presencia de agregados como se describió en el Ejemplo 15.

ELISA

45 El ELISA para detectar la unión a TNF- α humano se realizó esencialmente como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 33. La unión a TNF- α humano disminuye para TNF24 y TNF27, a partir de 60°C y

para TNF25, TNF26 y TNF28 a partir de 70°C.

Nanocuerpos monovalentes humanizados (segunda ronda)

Ejemplo 41: Identificación de posiciones de aminoácidos no humanos en nanocuerpos específicos de TNF-α y albúmina sérica

- 5 La Figura 34 (TNF1), Figura 35 (TNF2), Figura 36 (TNF3) y Figura 37 (ALB1) representan alineamientos de secuencias múltiples (Clustal W 1.7) con las secuencias DP51, DP53, DP54 y DP29 secuencias. Las moléculas mutadas se expresaron y purificaron como se describió anteriormente, lo que produce las secuencias de la Tabla 35 SEQ ID NOS: 95 a 104 (contra TNF-alfa y albúmina sérica humana, respectivamente).

Caracterización de nanocuerpos humanizados

- 10 Ejemplo 42: Nivel de expresión

La Tabla 36 representa los niveles de expresión calculados. La expresión se obtuvo con rendimientos en el rango de 0,5-2,7 mg/ml.

Ejemplo 43: SDS-PAGE

Se realizó el SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 38 representa el gel de SDS-Page.

- 15 Ejemplo 44: Transferencia Western

El análisis de transferencia Western se realizó como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 39 representa los resultados de la transferencia Western.

Ejemplo 45: Bioensayo

El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 13.

- 20 25 Los resultados de los nanocuerpos humanizados se sintetizan en la Tabla 37. Los nanocuerpos tipo salvaje y la primera ronda de nanocuerpos humanizados se incluyen como referencia.

Ejemplo 46: Biacore

El análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 12. La Figura 40 muestra los resultados del Biacore.

Ejemplo 47: Estabilidad a la temperatura

- 25 Las muestras se analizaron como se describió en el Ejemplo 15.

DO a 280 nm

Se midió la DO a 280 y se calculó la concentración. Los resultados se sintetizan en la Tabla 38.

- 30 No se observa disminución significativa en la concentración de proteína para los nanocuerpos humanizados TNF-1 (TNF29-30). Se observa una disminución de la concentración de proteína para TNF2 humanizado (TNF31-32) y TNF3 (TNF33) a partir de 800C.

Transferencia Western

Las muestras se analizaron para determinar la presencia de agregados como se describió en el Ejemplo 15.

ELISA

- 35 El ELISA para detectar la unión a TNF-α humano se realizó esencialmente como se describió en el Ejemplo 15, Los resultados se presentan en la Figura 41.

La unión a TNF-α humano es comparable para WT TNF1 y los TNF29 y TNF30 humanizados; comparable para WT TNF2 y los TNF31 y TNF32 humanizados; y también para WT TNF3 y TNF33 humanizado.

Ejemplo comparativo

- 40 En este Ejemplo comparativo, se compararon nueve Nanocuerpos de la invención con tres Nanocuerpos del documento WO 04/041862, llamados "V_{HH}#1A" o "1A", "V_{HH}#3E" o "3E" y "V_{HH}#3G" o "3G" respectivamente (SEQ ID NOS:1, 4 y 5 en el documento WO 04/041862). El ensayo usado fue el ensayo basado en células que usa células KYM con referencia al documento WO 04/41862 (ver por ejemplo, el Ejemplo 1, de acuerdo con 3). Los resultados se mencionan en la siguiente Tabla 34. Como se puede observar, los Nanocuerpos de la invención tienen un valor de EC50 en este ensayo que es 18 veces mejor que el valor de EC50 de 3E, el Nanocuerpo de mejor desempeño de acuerdo con WO

04/041862.

Ejemplo 48: Generación de Nanobodies™ humanizados biespecíficos trivalentes

Los Nanocuerpos biespecíficos trivalentes se formatearon y clonaron en el vector de expresión en *E. coli* pAX054 primero y posteriormente se rescataron a través de PCR y se clonaron en el vector de expresión pICZA.

5 3) Determinación de efecto antagonista en el ensayo de citotoxicidad con la línea celular KYM

Se determinó la citostasis/citotoxicidad inducido por TNF-alfa con el ensayo colorimétrico MTT descrito por Vandenabeele y colegas (Vandenabeele, P., Declercq, W, Vercammenn, D., Van de Craen, M., Grooren J., Loetscher, H., Brockhaus, M., Lesslauer, W., Fiers, W. (1992) Function caracterización of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoma. 3. Exp.Med. 176, 1015-1024.). El MTT bromuro de (3-(4,5-cimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) es un sustrato amarillo pálido que es escindido por las células vivas para producir un producto de formazano azul oscuro. Este proceso requiere mitocondrias activas, e incluso las células recién muertas no escinden cantidades significativas de MTT. Las células KYM (Sekiguchi M, Shiroko Y, Suzuki T, Imada M, Miyahara M, Fujii G. (1985) Characterization of a human rhabdomyosarcoma cell strain in tissue culture. Biomed. Pharmacother. 39, 372-380) se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos cultivada en presencia o ausencia de TNF-alfa (0,216 ng/ml o aprox. 5 pM del trímero). Además de TNF, se incluyeron de las cantidades variables del anticuerpo (V_{HH} o Remicade) durante el cultivo. Para el ensayo, se añadió MTT al medio de cultivo a una concentración final de 500 µg/ml y las placas se incubaron a 37°C para obtener la escisión de MTT por las enzimas mitocondriales. El producto de formazano formado, que aparece como cristales borrosos negros en la parte inferiro del pocillo, se disolvió por la adición de isopropanol ácido (40 nM HCl en isopropanol) o DMSO. La absorbancia se mide a 570 nm.

20 Descripción del vector de expresión de Escherichia coli

El pAX54 es un derivado de pUC19. Este contiene el promotor promotor LacZ que permite una inducción controlada de la expresión mediante IPTG. El vector tiene un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina. Los sitios de multiclonación albergan varios sitios de restricción de los cuales SfiI y BstTII se usan con frecuencia para la clonación de Nanobodies™. El péptido señal es la secuencia líder gen3 que transloca el Nanobody™ expresado en el periplasma.

25 Descripción del vector de expresión de Pichia pastoris

El pPICZoA contiene un origen de replicación de derivado de pUC que permite la propagación en *E. coli*. Este contiene el promotor del gen AOX1 de *Pichia pastoris* (alcohol oxidasa 1). Esta región promotora de 942 pb (i) permite la expresión de alto nivel inducible con metanol del gen de interés, y (ii) dirige la integración del plásmido al locus AOX1 después de la transformación de *Pichia* con el ADN del vector que se linealiza dentro de la región promotora 5' AOX1. Cabe mencionar que los vectores pPICZA no contienen un origen de replicación de levaduras y que, en consecuencia los transformantes solo se pueden aislar si la recombinación se produce entre el plásmido y el genoma de *Pichia*. El vector especifica la resistencia al antibiótico Zeocina en las células huésped de *E. coli* y *Pichia pastoris*. El vector incorpora la señal de secreción del factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción eficiente de la mayor parte de las proteínas en el medio de cultivo. El ATG de iniciación en la secuencia señal del factor α corresponde al ATG de iniciación nativa del gen de AOX1. El sitio de multiclonación alberga varios sitios de restricción de los cuales se usan normalmente XhoI/EcoR1 o XhoI/NotI para la fusión de las secuencias codificadoras de Nanocuerpo™ a la señal de secreción. El sitio de multiclonación es seguido por la región de terminación de la transcripción AOX1. Más detalles sobre este vector de expresión se pueden hallar en el sitio web de Invitrogen

(http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf).

40 Formateo de Nanocuerpos trivalentes

Se montaron tres reacciones de PCR separadas para amplificar la subunidad N-terminal, el medio y el C-terminal del Nanobody™ usando las combinaciones de oligo indicadas en WPA-0012. El Nanobody™ N-terminal se amplificó mediante M13_rev/Rev_9GlySer_L108; el Nanobody™ medio se amplificó mediante For_GlySer/Short y Rev_15BspE1_L108; el Nanobody™ C-terminal se amplificó mediante For_BspEI/M13_for. Se preparó una reacción de PCR de 1 µl de ADN del plásmido (50-100 µg), 1,5 µl de cebador delantero (10 µM → 300 nM), 1,5 µl de cebador inverso (10 µM → 300 nM), 1 µl de dNTP (10 mM → 0,2 mM), 5 µl de solución tampón (10x → 1x), 0,75 µl de enzima (3,5 U/µl → 2,6 U/µl) y 39,25 µl de H₂O con un volumen total de 50 µl. Las secuencias del cebador se dan en la Tabla 40. Se inició una programa de PCR con 2 minutos a 94°C. Un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C se repitió 30 veces y siguió 10 minutos a 72°C. La amplificación se examinó por la separación de 5 µl de la reacción de PCR en un gel de agarosa 2%. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación PCR QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y se eluyó con 50 µl de solución tampón EB. El fragmento de V_{HH} N-terminal se preparó por la incubación de 50 µl de ADN y 2 µl de BamHI (10 U/µl) en la solución tampón apropiada recomendada por el fabricante a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 2 µl de SfiI (10 U/µl) y la mezcla se incubó a 55°C durante 2 horas. El fragmento de V_{HH} medio se preparó por la incubación de 50 µl de ADN y 2 µl de BamHI (10 U/µl) en la solución tampón apropiada recomendada por el fabricante a 37°C durante 2 horas. El fragmento de V_{HH} C-terminal se preparó por la incubación de 50 µl de ADN y 2 µl de BspEI (10 U/µl) en la solución tampón apropiada recomendada por el fabricante a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 2 µl de

BstETI (10 U/μl) y la mezcla se incubó a 60°C durante 1 hora. Las reacciones de digestión previas se separaron en un gel de agarosa 2%. Las bandas de V_{HH} (350-450 pb) se cortaron del gel y el ADN se purificó usando el kit de extracción del gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna (con un máximo de 400 mg de gel de agarosa por columna) y el ADN eluido se eluyó con 50 μl de solución tampón EB. La concentración de ADN se determinó por la medición de la DO₂₆₀ (1 unidad de DO = 50 μg/ml). Se preparó una mezcla de ligamiento con un volumen final de 10 μl que contiene 100 ng de vector pAX54, 12 ng de V_{HH} N-terminal, 12 ng de fragmento medio de V_{HH}, 12 ng de fragmento C-terminal de V_{HH}, 1 μl de solución tampón de ligamiento y 1 μl de ligasa (3 U) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La transformación de E. coli, TG1 se realizó por medio de 2 μl de mezcla de ligamiento. Las colonias se analizaron mediante PCR como se describió en WPA-0010. El análisis de secuencia análisis se realiza en los clones positivos. La preparación del plásmido se realizó mediante el kit Qiaprep spin Miniprep kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se describió anteriormente. La secuenciación se realizó en al instalación de secuencia de VIB, Antwerp, Bélgica.

Amplificación del ADN codificador

La región codificadora del NanocuerpoTM en el vector de expresión de E. Coli AX054 se rescata a través de PCR mediante un par cebador apropiado. Para asegurar que el NanocuerpoTM se expresa con un extremo N-terminal nativo, la región codificadora se clona en marco con el sitio de escisión Kex2 de la señal de secreción. El cebador delantero se fusiona a la parte C-terminal de la señal de secreción, arriba del sitio de reconocimiento XhoI hasta la región codificadora del NanocuerpoTM. Se preparó una reacción de PCR de 1 μl de plásmido ADN (50-100 ng), 1,5 μl de cebador delantero (10 μM → 300 nM), 1,5 μl de cebador inverso (10 μM → 300 nM), 1 μl de dNTP (10 mM → 0,2 mM), 5 μl de solución tampón (10x → 1x), 0,75 μl de enzima (3,5 U/μl → 2,6 U/μl) y 39,25 μl de H₂O con un volumen total de 50 μl.

Las secuencias del cebador se dan en la Tabla 4L. Se inició una programa de PCR con 2 minutos a 94°C. Un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C se repitió 20 veces y siguió 10 minutos a 72°C. La amplificación se examinó por la separación de 5 μl de la reacción de PCR en un gel de agarosa 2%. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación PCR QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y ADN unido se eluyó con 50 μl de solución tampón EB.

Estrategia de clonación

El fragmento de ADN que codifica el vector de expresión de NB así como el pPICZaA se digiere con las enzimas de restricción apropiadas (XhoI + NotI). El inserto se obtiene por la incubación de 50 μl de producto de PCR con 2 μl de XhoI (10 U/μl) y 2 μl NotI (10 U/μl) en la solución tampón apropiada recomendada por el fabricante durante 3 horas a 37°C. El vector se obtiene de modo similar, se adapta la cantidad de enzimas de restricción a la cantidad de plásmido. Tanto el vector como el fragmento codificador de NB se purifican y se cuantifica la concentración de ADN mediante el BioPhotometer (Eppendorf). El fragmento y el vector aceptor se ligan en una relación equimolar mediante el uso de 1 Unidad de T4 ligasa (Promega) durante 30 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a 16°C. El ADN (20-30 ng) se transforma en las células TG1. Las colonias se analizan a través de PCR mediante los cebadores 3'AOXI R y 5'AOXI F. El análisis de secuencia se realiza en los clones positivos. Los TNF30, TNF33 y ALB8 se formatearon a NanocuerpoTM biespecíficos trivalentes. Como espaciador entre los bloques de construcción se usó un ligador 9AA GlySer.

Transformación de P. pastoris

Para aislar el ADN del plásmido, se inicia un precultivo por la inoculación de una colonia única del clon en 50 ml de caldo Luria + ampicilina o carbenicilina (100 μg/ml) + 2% de glucosa e incubación a 37°C durante toda la noche. El ADN del plásmido se prepara mediante el kit Plasmid Midi (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se linealiza por la incubación de 30 μg de ADN del plásmido con 6 μl de BstXI (10 U/μl) en la solución tampón apropiada de acuerdo con las instrucciones del fabricante durante 3 horas a 45°C. El ADN digerido se purifica mediante el kit de Purificación de PCR (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se concentra mediante precipitación EtOH de acuerdo con procedimientos estándares. Las células electrocompetentes X-33 se transforman con 10 μg de ADN linealizado y las células se dejan crecer durante 48 horas en una placa de agar selectivo YPD que contiene Zeocina (100/250/500 μg/ml). La X-33 es una cepa de Pichia pastoris tipo salvaje; la cepa misma así como las cepas recombinantes derivadas contienen el gen AOX1 nativo y son capaces de metabolizar metanol (Mut).

Los clones se analizan para determinar el nivel de expresión por la inoculación de colonias individuales en 1 ml de BGCM en una placa de 24 pocillos y se los cultiva durante 48 horas a 30°C a 120 rpm. Las células se centrifugan y se añade BGCM fresco a las células para el cultivo a 30°C a 120 rpm durante 48 horas. Después, se añade MeOH a una concentración final de 0,5% y las células se cultivan a 30°C a 120 rpm durante 8 horas, después de lo cual se añade MeOH a una concentración final de 0,5%. Las células se cultivan durante toda la noche a 30°C a 120 rpm. Las células se centrifugan y el sobrenadante se recolecta y analiza en ELISA como se describió en el Ejemplo 10.

Ejemplo 49: Expresión y purificación de NanocuerposTM humanizados biespecíficos trivalentes

Producción en *Pichia pastoris*

La composición de soluciones tampón, soluciones y otros se pueden hallar en el sitio web de Invitrogen (http://wetw.invitrogen.com/content/sffs/manual/ppiczalpha_man.pdf). Un precultivo se inició por la inoculación de una colonia única de una placa en 5 ml de YPD. El cultivo se cultivó durante toda la noche a 180 rpm y 30°C. El día siguiente, el precultivo se diluyó a 50 ml de YPD y se cultivó durante toda la noche a 180 rpm y 30°C. Los cultivos de producción se iniciaron por la inoculación del precultivo a una DO600nm final= 0,04-0,08. Los cultivos se cultivaron en BGCM durante 24 horas a 30°C a 180 rpm y se centrifugaron a 4.500 rpm durante 30 minutos. Las células se resuspendieron en 1/3 del volumen original en medio BGCM con una DO600 nm = 15-20 final. Las células se indujeron con MeOH en puntos de tiempo regulares, normalmente 3 veces/día, nunca excediendo el 1% del contenido de MeOH. Después de 50 horas de inducción se recolecta el sobrenadante.

Purificación de nanocuerpos expresado en *Pichia psatoris*

El sobrenadante del cultivo se filtra sobre una membrana de filtración de 22 µm Micro filtration (Hydrosart, Sartorius). La muestra se concentra mediante diafiltración en una membrana de filtración de 10kDa (HydroSart, Sartorius) y se concentró a 0,5-1L.

Los NanocuerposTM se purifican mediante cromatografía de afinidad de Proteína A (MabSelect Xtra, GE Healthcare) mediante PBS como solución tampón de corrida y Glicina (100 mM pH=2,5) para la elución. Las muestras se neutralizan mediante Tris 1,5 M pH=8.8. Los NanocuerposTM se procesan adicionalmente en Cromatografía de intercambio aniónico (Source 30Q, GE Healthcare). Las muestras se diluyen 10 veces con 10 mM de piperazina pH=10,2 y se ajusta a pH=10,2 con NaOH 1 M y una conductividad de <2mS/cm con agua MilliQ.

Los Nanocuerpos se procesan por cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75pg, Hiload XK26/60, GE Healthcare) y el LPS se extrae por Cromatografía de intercambio aniónico (Source 30Q, GE Healthcare) por el pasaje a través de una columna de 5 ml, que se desinfecta con NaOH 1 M y se equilibra en PBS Dulbecco.

Para determinar la pureza, las muestras de proteína se analizaron en un gel de SDS-PAGE 15% como se describió en el Ejemplo 8. El gel se procesa mediante el SilverQuestTM de acuerdo con los procedimientos generales descritos por el fabricante (Invitrogen). Alternativamente, el gel se procesa mediante azul brillante coomassie o en transferencia western como se describió en el Ejemplo 8 y 9. Los resultados se dan en la Figura 42.

Ejemplo 50: Caracterización de NanocuerposTM humanizados biespecíficos trivalentes

TNF60 consiste en 363 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 38.441 Da. El pH es 8,71. El coeficiente de extinción a 280 nm es 1,736.

30 Espectrometría de masa

La masa de la proteína se determinó en ESI-MS de acuerdo con procedimientos estándares.

La masa teórica de TNF60 es 38.441 Da. La proteína tiene 2 puentes S-S que deben resultar en una masa de 38.435 Da en ESI-MS. El masa que determinó experimentalmente para TNF60 derivado de 3 lotes diferentes varía de 38.433 Da a 38.435 Da, que difiere como máximo 0,005% con la masa teórica.

35 Secuenciación N-terminal

La secuenciación N-terminal se realizó por la degradación de Edman de acuerdo con procedimientos estándares. La secuenciación N-terminal mostró que la secuencia de la proteína para los primeros 7 aminoácidos es la siguiente: EVQLVES. Esto es compatible con la secuencia de la proteína teórica, que indica el procesamiento N-terminal apropiado.

40 Distribución por tamaño analítico

Las muestras (100 µg) se analizaron en la columna de alta resolución Superdex75, para caracterizar los diferentes lotes de NanocuerpoTM. La cromatografía de exclusión por tamaño del NanocuerpoTM normalmente produce un pico simétrico, con un tiempo de retención de 11,5 minutos en Superdex75. La absorbancia se registra normalmente a 280, 254 y 214 nm. La medición de 214 nm permite la mayor sensibilidad de detección. La distribución por tamaño analítico en PBS proporciona un pico simétrico. No se observaron contaminantes. El tiempo de retención observado para 3 lotes diferentes es 11,5-11,55 minutos. Un perfil representativo se muestra en la Figura 43.

Ejemplo 51: Unión de TNF60 a TNFα humana en ELISA

La funcionalidad de TNF60, es decir la unión al TNF-α humano se analizó por ELISA como se describió en el Ejemplo 10. Los resultados se sintetizan en la Figura 44 y demuestran claramente una unión dependiente de la dosis y saturable de 2 lotes de TNF60 al TNF-α humano.

Ejemplo 52: Funcionalidad del ensayo basado en células

La potencia para neutralizar la actividad citotóxica de TNF α se analizó en un ensayo basado en células que se describió en el Ejemplo 13. Los resultados se sintetizan en la Tabla 42 y en las Figuras 45 y 46.

5 Los datos muestran que TNF60 tiene potencia en el rango de Enbrel/Etanercept y 10 veces mejor potencia que Humira/Adalimumab y Remicade/Inflixmab.

Ejemplo 53: Unión de TNF60 a la albúmina sérica

La unión a la albúmina sérica humana y de rhesus se analizó en Biacore como se describió en el Ejemplo 12. Los valores de K_D , k_{on} y k_{off} se representan en la Tabla 43. TNF60 se compara con TNF24, que es el Nanocuerpo™ biespecífico trivalente original con bloques de construcción tipo salvaje.

10 La afinidad de TNF60 por la albúmina sérica humana y de rhesus es similar. La afinidad es 2 veces más baja en comparación con la afinidad observada para TNF24 que es el análogo tipo salvaje de TNF60. K_{on} es idéntica para ambas moléculas, pero la k_{off} es 2 veces más alta para TNF60.

Ejemplo 54: Análisis farmacocinético y de inmunogenicidad de los Nanocuerpos humanizados biespecíficos trivalentes en los ratones

15 Animales

Los ratones DBA1 o BALBc se calentaron bajo una lámpara infrarroja y se inyectaron 200 μ l de Nanobody™ (100 μ g por ratón) por vía intravenosa en la cola. Se obtuvieron muestras de sangre en diferentes puntos de tiempo haciendo una incisión en la cola y recolectando la sangre en un microtubo. Normalmente, la sangre se muestreó a $t=15$ min, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 14 días. El suero se preparó de acuerdo con procedimientos estándares.

20

Determinación de la concentración Nanocuerpo™ en suero de ratón

Una placa de microtitulación (NUNC, Maxisorb) se recubrió con 2 μ g/ml de neutravidina durante toda la noche a 4°C. La placa se lavó 5 veces con PBS/0,05% de Tween-20 y se bloqueó durante 2 horas a RT con PBS/1% de caseína. El TNF- α humano biotinilado (1/2000 en PBS/0,2% de caseína; 400 ng/ml) se aplicó en los pocillos y se incubó durante 1 hora a RT. El Nanobody™ de referencia se aplicó a partir de una concentración de 5 μ g/ml y mediante diluciones de 5 veces en PBS que contiene 1% de plasma de ratón. Los Nanocuerpos™ se dejaron unir durante 2 horas a RT.

25

La placa se lavó 5 veces y se aplicó anti-Nanocuerpo policlonal de conejo (R23) a una dilución de 2000 veces durante una hora a RT. Después del lavado de la placa, se detectó la unión con HRP de anti-conejo policlonal de cabra (DAKD) a una dilución de 3000 durante una hora a RT, y se tiñó con ABTS/H₂O₂. Se midió la DO de 405 nm.

30

Este primero ELISA se usó para determinar el rango lineal de la referencia estándar. En un segundo ELISA, la referencia estándar se usó en concentraciones en este rango lineal y normalmente mediante diluciones de 2 veces. En este segundo ELISA, las muestras de ensayo de suero se diluyeron 100 veces y otras diluciones de 5 veces se obtuvieron en 1% de plasma de ratón, para determinar la dilución a la que las muestras séricas proporcionan una lectura en el rango lineal de la curva estándar. En un tercer ELISA, las muestras séricas se diluyen en una concentración apropiada determinada en el segundo ELISA y mediante diluciones de 2 veces para la determinación exacta de la concentración de Nanobody™ en las muestras de suero.

35

Los experimentos se realizaron para determinar el perfil farmacocinética de TNF60 en los ratones (n 3). Un valor de C_{max} de $103,84 \pm 31$ μ g/ml se alcanzó 15 minutos después de la administración. Se determinó que la vida media ($t_{1/2\beta}$) es 1,9 días, similar a la vida media de la albúmina sérica de ratón, que indica que TNF60 adopta la vida media de la albúmina sérica. Los datos se presentan en la Figura 47.

40

Determinación de anticuerpos anti-Nanocuerpos en los ratones

El Nanobody™ se recubrió con 5 μ g/ml en PBS a 4°C durante toda la noche. La placa se lavó 5 veces con PBS/0,05% Tween-20 y bloqueó durante 2 horas a RT con PBS/1% de caseína. Las muestras séricas se diluyeron 100 veces y aplicaron a los pocillos para incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante HRP de anti-ratón policlonal de conejo diluido 1000 veces (DAKO, P0260) y mediante ABTS como sustrato.

45

Las muestras de suero se diluyeron 50 veces y analizaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-TNF60 de ratón. La carencia de inmunogenicidad se demostró para TNF60. Los datos se presentan en la Figura 48.

Ejemplo 55: Generación de Nanocuerpos™ humanizados de larga vida bivalentes

Descripción del vector de expresión de Pichia pastoris:

50 Ver ejemplo 48

Formateo de Nanocuerpos™ bivalentes

Se montaron dos reacciones de PCR separadas para amplificar la subunidad N-terminal y C-terminal del Nanobody™ mediante los procedimientos indicados en WPA-0011. Para la amplificación del Nanobody™ N-terminal se usaron PiForLong y Rev_30GlySer L108 como combinación del cebador; para la amplificación del Nanobody™ C-terminal se usaron For_GlySer y PiRevCys1hum o alternativamente For_GlySer y PiRevCys2hum, se introducen los sitios de restricción requeridos para el formateado y los residuos de cisteína libres requeridos para las modificaciones.

Se preparó una reacción de PCR de 1 µl de ADN del plásmido (50-100 µg), 1,5 µl de cebador delantero (10 µM → 300 nM), 1,5 µl de cebador inverso (10 µM → 300 nM), 1 µl de dNTP (10 mM → 0,2 mM), 5 µl de solución tampón (10x → 1x), 0,75 µl de enzima (3,5 U/µl → 2,6 U/µl) y 39,25 µl de H₂O con un volumen total de 50 µl. Las secuencias del cebador se dan en la Tabla 44. Se inició una programa de PCR con 2 minutos a 94°C. Un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C se repitió 30 veces y siguió 10 minutos a 72°C. La amplificación se examinó por la separación de 5 µl de la reacción de PCR en un gel de agarosa 2%. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación PCR QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y se eluyó con 50 µl de solución tampón EB. El fragmento de V_{HH} N-terminal se preparó por la incubación de 50 µl de ADN y 2 µl de BamHI (10 U/µl) en la solución tampón apropiada recomendada por el fabricante a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 2 µl de Sfil (10 U/µl) y la mezcla se incubó a 55°C durante 2 horas. El fragmento de V_{HH} medio se preparó por la incubación de 50 µl de ADN y 2 µl de BamHI (10 U/µl) y 2 pXhoI (10 U/µl) en la solución tampón apropiada recomendada por el fabricante a 37°C durante 1,5 horas. El fragmento de V_{HH} C-terminal se preparó por la incubación de 50 µl de AD, 2 µl de BamHI (10 U/µl) y 2 µl de EcoRI (10 U/µl) en la solución tampón apropiada recomendada por el fabricante a 37°C durante 1 hora. Las reacciones de digestión previas se separaron en un gel de agarosa 2%. Las bandas de V_{HH} (350-450 pb) se cortaron del gel y el ADN se purificó usando el kit de extracción del gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó una columna (con un máximo de 400 mg de gel de agarosa por columna) y el ADN unido se eluyó con 50 µl de solución tampón EB. La concentración de ADN se determinó por la medición de la DO₂₆₀ (1 unidad de DO = 50 µg/ml). Se preparó una mezcla de ligamiento con un volumen final de 10 µl que contiene 100 ng de vector pPICZaA, linealizado con XhoI/EcoRI, 30 ng de V_{HH} N-terminal, 30 ng de fragmento V_{HH} C-terminal, 1 µl de solución tampón de ligamiento y 1 µl de ligasa (3 U) y se incubó durante 1 hora a RT. La transformación de E. coli, TG1 se realizó por medio de 2 µl de mezcla de ligamiento. Las colonias se analizan mediante PCR como se describió en WPA-0010, pero mediante la combinación de cebadores AOXIFor/AOXIRev. El análisis de secuencia análisis se realiza en los clones positivos. La preparación del plásmido se realizó mediante el kit Qiaprep spin Miniprep kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se describió anteriormente. La secuenciación se realizó en al instalación de secuencia, Antwerp, Bélgica.

Transformación de P. pastoris

Ver ejemplo 48.

El F30 se formateó a Nanocuerpos bivalentes™. Como espaciador entre los 2 bloques de construcción se usó un ligador 30 AA GlySer. Para permitir las modificaciones específicas de sitio C-terminal, se introdujo una cisteína libre, sea como el último AA del nanocuerpo o con un espaciador extra que consiste en GlyGlyGlyCys. (SEQ ID No=471),

Ejemplo 56: Expresión y purificación de Nanocuerpos™ humanizados de larga vida bivalentes

Producción en Pichia pastoris

Ver ejemplo 49

Purificación de Nanocuerpos bivalentes

El medio de cultivo se obtuvo libre de células por medio de centrifugación y filtración de 0,2 µm. El medio estéril se conservó a 4°C hasta el procesado posterior. Los contaminantes de bajo peso molecular se redujeron por medio de ultra filtración en una membrana de ultra filtración e 10 kDa (UF) (HydroSart Sartocoon Slice Cassette, Sartorius) de la siguiente manera: cuatro litros de medio se concentraron a 0,5-1 litro, posteriormente se diluyeron con 5 litros de PBS y se concentraron de nuevo a 0,5 litro. Esta acción se llevó a cabo dos veces.

El retenido del DE se filtró a través de membranas de nylon de 47 mm 0,45 µm (Alltech #2024).

En una etapa próxima se capturó el Nanobody™ bivalente a partir del medio concentrado por medio de purificación de afinidad de Proteína A (mediante MabSelectXtra™, GE Healthcare). La columna [35X100mm] se equilibró en PBS y después de la aplicación de la muestra se lavó exhaustivamente con PBS. El TNF56 eluyó con Glicina [100 mM, pH=2.5].

Las fracciones eluidas de MabSelectXtra™ se neutralizaron con Tris [1,5 M, pH 8,8] y se almacenaron a 4°C. El TNF56 se concentró y purificó por medio AEX (A= 10 mM de piperazina, pH 10,8 y B=1 M de NaCl en Tris 50 mM, pH 7,5) mediante Source 30Q (GE Healthcare). Para este fin las fracciones de Nanobody™ se diluyeron con solución tampón A (10 mM de piperazina, pH 10,8) a una conductividad de 5 mS/cm y el pH se ajustó a 10,8. La columna [25X100mm] se equilibró en una solución tampón A antes de cargar la muestra en la columna. El TNF56 se eluyó con un gradiente de 5

volúmenes de columna (CV). El pH de las fracciones recolectadas se ajustó a 7,8 mediante Tris 1 M pH=7.8.

Pegilación de Nanocuerpos bivalentesTM expresados en *Pichia pastoris*

Reducción de cisteínas C-terminales

- 5 Se añadió ditiotreitól (DTT, Aldrich Cat 15,046-0) a las fracciones neutralizadas para reducir los potenciales puentes disulfuro que se forman entre las cisteínas carboxi terminal de los NanocuerposTM (usualmente alrededor de 20%). Se halló que una concentración final de 10 mM de DTT e incubación durante toda la noche a 4°C es óptima. La reducción se evaluó por cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC). En consecuencia, 25 µl de NanocuerpoTM reducido se añadieron a 75µl de D -PBS y se inyectaron en una columna Sup75 101300 GL equilibrada con PBS de Dulbecco (D-PBS, GibcoTM REF 14190-094).
- 10 El NanocuerpoTM no reducido y DTT se extrajeron por SEC preparativa en una columna Hiloal 26160 Superdex75 de grado preparativo equilibrada con D-PBS.
- 15 Se midió la concentración del NanocuerpoTM reducido por la medición de la absorbancia a 280 nm. Se usó un espectrofotómetro UV/VIS de doble haz Uvikon 943 (procedimiento: ver SOP ABL-0038). La absorción se midió en un barrido de longitud de onda 245-330 nm. Se usaron dos celdas Precision hechas de Quartz Suprasil® (Hellma tipo No.: 104-QS; paso de luz: 10 mm), Primero se midió la absorción del blanco a 280 nm por la colocación de las dos celdas cargadas con 900 µl de D-PBS. La muestra se diluyó (1/10) por la adición de 100µl de la muestra a la primera celda. La absorción de la muestra se midió a 280 nm.

$$\frac{DO_{280} \text{ Muestra} - DO_{280} \text{ Blanco}}{\epsilon \times l} \times 10$$

Se calculó la concentración con la siguiente fórmula:

Para TNF55: $\epsilon=1,85$

- 20 Para TNF56: $\epsilon =1,83$.

Pegilación

Para PEGilar NanobodyTM se añadió un exceso molar 5X de una solución de PEG40 1 M recién preparado a la solución de NanocuerpoTM reducido. (MPEG2-MAL-40K de NEKTARTM)

- 25 Transforming Therapeutics (2D3YOTOI) PM = 40.000 g/mol; MPEG2-MAL-60K de NEKTARTM Transforming Therapeutics (2D3YOVOI) PM = 60.000 g/mol).

La mezcla de NanobodyTM-PEG se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) con agitación suave y posteriormente se transfirió a 4°C. La PEGilación se evaluó por medio de SEC analítica. En consecuencia, 25 µl de NanocuerpoTM reducido se añadieron a 75µl de D -PBS y se inyectaron en una columna Sup75 101300 GL equilibrada con PBS de Dulbecco. El NanocuerpoTM pegilado eluyó en el rango del volumen de exclusión de la columna (>75kDa).

- 30 El NanobodyTM PEGilado y no PEGilado se separaron por medio de cromatografía de intercambio catiónico (CEX, mediante Source30S, GE Healthcare; solución tampón A =25 mM de ácido cítrico pH=4 y B=1 M NaCl en PBS). La muestra se diluyó a una conductividad de <5 mS/cm y el pH se ajustó a 4,0. La columna [25X100mm) se equilibró y después de la aplicación se lavó exhaustivamente con solución tampón A. El NanobodyTM PEGilado se eluyó con un gradiente de 3 CV.
- 35 El NanobodyTM recolectado se intercambié con la solución tampón a D-PBS por SEC en una columna Hiloal 26/60 Superdex 75 de grado preparativo equilibrada en D-PBS.

Finalmente el NanobodyTM se obtuvo libre de LPS por medio del pasaje sobre una columna de intercambio aniónico (Source30Q). La columna (10x100mm) se desinfectó durante toda la noche en NaOH [1 M) y después se equilibra en D-PBS libre de endotoxina.

- 40 Biotinilación

Para biotinar el NanobodyTM se añadió un exceso molar 5X de biotina (EZ-Link® Maleimide-PO2-Biotin, Pierce #21901) a partir de una solución patrón de 10 mM al NanobodyTM reducido (ver 5.5.1). La mezcla de biotina-NanobodyTM se incubó durante 1 hora a RT con agitación suave y posteriormente se almacenaron a 4°C.

- 45 La pureza de NanobodyTM biotinilado se controló por medio de SEC analítica. En consecuencia, 25 µl de NanobodyTM biotinilado se añadieron a 75µl de D -PBS y se inyectaron en una columna Sup75 10/300 GL equilibrada en D-PBS. A partir del cromatograma obtenido se pudo concluir que el NanobodyTM-biotina no necesita purificación adicional: no se pudo detectar dimerización del NanobodyTM por medio de una oxidación de sulfhidrilos libres. Se realizó un cambio de solución tampón al D-PBS por un pasaje sobre una columna de desalinización Sephadex G25 fina (90 ml).

Finalmente se obtuvo Nanobody™-biotina libre de LPS por el pasaje sobre una columna de intercambio catiónico (Source30Q, GE Healthcare). La columna (1x10 cm) se desinfectó durante toda la noche en NaOH [1 M] y después se equilibra en D-PBS.

5 Para determinar la pureza, las muestras de proteína se analizaron en un gel de SDS-PAGE 15% como se describió en el Ejemplo 8 y 49. Los resultados se presentan en la Figura 49 y 50.

Ejemplo 57: Caracterización de Nanocuerpos™ de larga vida humanizados bivalentes

Caracterización bioquímica

El TNF55 consiste en 260 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 27.106 Da. El pH es 8,67. El coeficiente de extinción a 280 nm es 1,850.

10 El TNF56 consiste en 264 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 27,365 Da. El pH es 8,67. El coeficiente de extinción a 280 nm es 1,830.

Espectrometría de masa

La masa teórica de TNF55 es 27.106 Da. La proteína de TNF55-Biotina tiene 2 puentes S-S y una modificación de biotina que puede producir una masa de 27.627 Da en ESI-MS.

15 La masa que se determinó experimentalmente para TNF55-biotina es 27.627 Da.

La masa teórica de TNF56 es 27,365 Da. La proteína de TNF56-Biotina tiene 2 puentes S-S y a modificación de biotina que puede producir una masa de 27.886 Da en ESI-MS. La masa que se determinó experimentalmente para TNF56-biotina es 27.886 Da.

261

20 Secuenciación N-terminal

La secuenciación N-terminal de TNF56-PEG40 mostró que la secuencia de la proteína para los primeros 7 aminoácidos es la siguiente: EVQLVES. Esto es compatible con la secuencia de la proteína teórica, que indica el procesamiento N-terminal apropiado.

Distribución por tamaño analítico

25 La distribución por tamaño analítico de TNF56-PEG40 en PBS proporciona un pico simétrico. No se observaron contaminantes. El tiempo de retención observado es 8,5 ml en Superdex HR 75 y 10,32 ml en Superdex HR 200. Un perfil representativo se muestra en las Figuras 51 y 52.

Ejemplo 58: Funcionalidad del ensayo basado en células

30 La potencia para neutralizar la actividad citotóxica de TNF α se analizó en un ensayo basado en células. Se examinó la potencia en diferentes concentraciones de Nanocuerpo™ así como de Enbrel, Humira y Remicade disponibles en el comercio sobre una base molar. A mayor EC50 observa menor actividad del compuesto para neutralizar TNF- α .

Los resultados se sintetizan en la Tabla 45 y Figures 53 y 54.

35 Los datos muestran que un aumento de la potencia para los Nanocuerpos™ bivalentes cuando se compararon con el Nanocuerpo™ monovalente TNF1. La potencia de los derivados de TNF55 es similar a los derivados de TNF56, que esté en el rango de Enbrel y 10 veces mejor que Humira y Remicade.

Ejemplo 59: Análisis farmacocinético y de inmunogenicidad de los Nanocuerpos humanizados de larga vida bivalentes en los ratones

Ver ejemplo 54

40 Los experimentos se realizaron a fin de examinar la vida media de los Nanocuerpos™ pegilados en los ratones. La vida media de TNF56-PEG40 bivalente se comparó con la vida media de TNF56-PEG60. Ambos Nanocuerpos™ tienen vida media comparable de ~ 2 días. Los resultados se presentan en la Figura 55.

45 Además, se exploró la vida media de 3E-3E bivalente pegilado. La vida media de 3E-3E-PEG20 se comparó con la vida media de 3E-3E-PEG40 después de la administración intravenosa de 100 μ g de los Nanocuerpos™. 3E-3E-PEG20 tiene una vida media de 17 horas, mientras que 3E-3E-PEG40 tiene una vida media de 2,1 días, comparable con la vida media de 3E-3E-MSA21. Los resultados se presentan en la Figura 56.

Las muestras de suero se diluyeron 100 veces y analizaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-TNF56-PEG40 o anti-TNF56-PEG60 de ratón. Se demostró la carencia de inmunogenicidad para ambas moléculas. Los datos

se presentan en la Figura 57.

Ejemplo 60: Eficacia de los Nanocuerpos anti-TNF α TNF60 en la prevención de poliartritis crónica

5 Las líneas de ratón transgénico que portan y expresan un transgén del factor de necrosis tumoral humano modificado 3' (hTNF-alfa, cachectina) se usaron como modelo para estudiar la eficacia de TNF60 (TNF60) para prevenir el desarrollo de la artritis (EMBO J. 10, 4025-4031). Se ha mostrado que estos ratones desarrollan poliartritis crónica con 100% de incidencia a las cuatro a siete semanas.

A partir de la tercera semana, las crías de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de iniciar el estudio, se calculó el peso corporal promedio para cada grupo. A partir de este momento, durante el estudio del animal completo se registraron los pesos una vez por semana para cada grupo.

10 Para examinar la eficacia de TNF60 en la prevención de poliartritis crónica, se dieron inyecciones intraperitoneales dos veces por semana a cada animal de un grupo particular de acuerdo con el siguiente esquema:

-Grupo 1 (control negativo): solución salina regulada con fosfato (PBS) (solución tampón de la formulación)

-Grupo 2 (Tratamiento con Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 30 mg/kg

-Grupo 3 (Tratamiento con Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg

15 -Grupo 4 (Tratamiento con Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 3 mg/kg

-Grupo 5 (1er control positivo): Enbrel a una dosis final de 30 mg/kg

-Grupo 6 (1er control positivo): Enbrel a una dosis final de 10 mg/kg

25 -Grupo 7 (2do control positivo): Remicade a una dosis final de 30 mg/kg

-Grupo 8 (2do control positivo): Remicade a una dosis final de 10 mg/kg

20 -Grupo 9 (2do control positivo): Remicade a una dosis final de 3 mg/kg

Para cada grupo, se indicaron las fechas de inyección y los volúmenes de inyección.

Las inyecciones continuaron durante siete semanas. Durante este período, se registraron las puntuaciones clínicas por la observación de cambios macroscópicos en la morfología de las articulaciones para cada animal.

25 A las 10 semanas, todos los ratones se sacrificaron y se recolectaron suero y articulaciones. Los sueros se conservaron a -70°C y las articulaciones del tobillo se conservaron en formalina.

En los grupos seleccionados, las articulaciones del tobillo se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Las secciones de las articulaciones del tobillo posteriormente se usaron para la evaluación histopatológica de la progresión de la enfermedad. Los resultados se ilustran en la figura 58.

Ejemplo 61: Eficacia de los Nanocuerpos anti-TNF α TNF60 en el tratamiento terapéutico de la poliartritis crónica

30 Las líneas de ratón transgénico que portan y expresan un transgén del factor de necrosis tumoral humano modificado 3' (hTNF-alfa, cachectina) se usaron como modelo para estudiar la eficacia de TNF60 (TNF60) para prevenir el desarrollo de la artritis (EMBO J. 10, 4025-4031). Se ha mostrado que estos ratones desarrollan poliartritis crónica con 100% de incidencia a las cuatro a siete semanas.

35 A partir de la sexta semana, las crías de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de iniciar el estudio, se calculó el peso corporal promedio para cada grupo. A partir de este momento, durante el estudio del animal completo se registraron los pesos una vez por semana para cada grupo.

Para examinar la eficacia de TNF60 en el tratamiento terapéutico de la poliartritis crónica, se dieron inyecciones intraperitoneales dos veces por semana a cada animal de un grupo particular de acuerdo con el siguiente esquema:

-Grupo 1 (control negativo): solución salina regulada con fosfato (PBS) (solución tampón de la formulación)

40 -Grupo 2 (Tratamiento con Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 30 mg/kg

-Grupo 3 (Tratamiento con Nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg

-Grupo 4 (1er control positivo): Enbrel a una dosis final de 30 mg/kg

-Grupo 5 (2do control positivo): Remicade a una dosis final de 30 mg/kg

Para cada grupo, se indicaron las fechas de inyección y los volúmenes de inyección.

Las inyecciones continuaron durante siete semanas. Durante este período, se registraron las puntuaciones clínicas por la observación de cambios macroscópicos en la morfología de las articulaciones para cada animal.

A las 13 semanas, todos los ratones se sacrificaron y se recolectaron suero y articulaciones. Los sueros se conservaron a -70°C y las articulaciones del tobillo se conservaron en formalina.

- 5 En los grupos seleccionados, las articulaciones del tobillo se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Las secciones de las articulaciones del tobillo posteriormente se usaron para la evaluación histopatológica de la progresión de la enfermedad. Los resultados se ilustran en la figura 59.

Ejemplo 62: Efecto del formateado sobre la eficacia de un Nanocuerpo anti-TNF- α en la prevención de poliartritis crónica

- 10 Las líneas de ratón transgénico que portan y expresan un transgén del factor de necrosis tumoral humano modificado 3' (hTNF-alfa, cachectina) se usaron como modelo para estudiar la eficacia de Nanocuerpo anti-TNF- α formateado de diferentes maneras en la prevención de poliartritis crónica (EMBO J. 10, 4025-4031). Se ha mostrado que estos ratones desarrollan poliartritis crónica con 100% de incidencia a las cuatro a siete semanas.

- 15 A partir de la tercera semana, las crías de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de iniciar el estudio, se calculó el peso corporal promedio para cada grupo. A partir de este momento, durante el estudio del animal completo se registraron los pesos una vez por semana para cada grupo.

Para examinar la eficacia de Nanocuerpo anti-TNF- α en diferentes formatos para la prevención de poliartritis crónica, se dieron inyecciones intraperitoneales dos veces por semana a cada animal de un grupo particular de acuerdo con el siguiente esquema:

- Grupo 1 (control negativo): solución salina regulada con fosfato (PBS) (solución tampón de la formulación)
- 20 -Grupo 2 (Formato de Nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg
- Grupo 3 (Formato de Nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 2-5 mg/kg
- Grupo 4 (Formato de Nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 1 mg/kg
- Grupo 5 (Formato de Nanocuerpo 2): TNF56-PEG40 a una dosis final de 10 mg/kg
- Grupo 6 (Formato de Nanocuerpo 2): TNF56-PEG40 a una dosis final de 1.8 mg/kg
- 25 -Grupo 7 (Formato de Nanocuerpo 2): TNF56-PEG40 a una dosis final de 0.7 mg/kg
- Grupo 8 (Formato de Nanocuerpo 3): TNF56-biot a una dosis final de 1.8 mg/kg
- Grupo 9 (Formato de Nanocuerpo t 4): TNF30 a una dosis final de 1 mg/kg
- Grupo 10 (Formato de Nanocuerpo 5): TNF1 a una dosis final de 1 mg/kg
- Grupo 11 (1er control positivo): Enbrel a una dosis final de 10 mg/kg
- 30 -Grupo 12 (2do control positivo): Remicade a una dosis final de 10 mg/kg

Para cada grupo, se indicaron las fechas de inyección y los volúmenes de inyección.

Las inyecciones continuaron durante siete semanas. Durante este período, se registraron las puntuaciones clínicas por la observación de cambios macroscópicos en la morfología de las articulaciones para cada animal.

- 35 A las 10 semanas, todos los ratones se sacrificaron y se recolectaron suero y articulaciones. Los sueros se conservaron a -70°C y las articulaciones del tobillo se conservaron en formalina.

En los grupos seleccionados, las articulaciones del tobillo se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Las secciones de las articulaciones del tobillo posteriormente se usaron para la evaluación histopatológica de la progresión de la enfermedad. Los resultados se ilustran en la figura 60.

Ejemplo 63: Estudio farmacocinética de Nanocuerpo anti-TNF- α TNF60 (TNF60) y TNF56-PEG40 en mono rhesus

- 40 Los monos rhesus criados en cautiverio (*Macaca mulatta*) se usan para determinar el perfil farmacocinética de TNF60 y TNF56-PEG40.

- 45 Se usan dieciséis animales en este estudio (ocho machos y ocho hembras) y se dividen en cuatro grupos (dos machos y dos hembras por grupo). Todos los animales pesaban aproximadamente 5 kg y están libres de enfermedad durante al menos seis semanas antes de usar. Sniff® Pri vegetarisch V3994 sirve como alimento. Se ofrecen sesenta g/kg b.w. a cada mono. El residuo se retira. A intervalos regulares (al menos dos veces al año) se analiza el alimento sobre la base

de EPA/USA para contaminantes por LUFA-ITL. Se ofrece agua corriente ad libitum. Los animales de cada grupo de tratamiento se alojan en un bloque de varias jaulas adyacentes dentro de la unidad de los monos. Los monos se mantienen en forma individual en jaulas de acero V2A con un tamaño de 90 cm x 82 cm x 96 cm. La temperatura ambiente se mantiene a 23°C ± 3°C (rango máximo) y la humedad relativa a 60% ± 20% (rango máximo). Las desviaciones del rango máximo causadas por ejemplo durante el procedimiento de limpieza se tratan con las SOP. Las habitaciones son iluminadas y oscurecidas durante períodos de 12 horas cada uno.

Dos grupos se infunden con TNF60 y dos grupos se infunden con TNF56-PEG40.

Las infusiones intravenosas de TNF60 y TNF56-PEG40 (disuelto en PBS) en la vena cefálica del brazo derecho o izquierdo mediante catéteres permanentes y una bomba de infusión de TSE (ver a continuación) se administran a una dosis fija de 2 mg/kg.

Se realizan cuatro administraciones únicas separadas por un período de lavado de al menos catorce días. Después de la última administración el período de seguimiento es al menos de ocho semanas. Dos de cuatro grupos se tratan con TNF60 o TNF56-PEG40 en combinación con metotrexato (MTX) (disuelto en PBS). El Grupo 2 se trata con TNF60 y MTX; el grupo 4 se trata con TNF56-PEG40 y MTX. MTX se administra en forma semanal por vía intramuscular a razón de 0,2 mg/kg. En los días de administración días, MTX se aplica aproximadamente 30 minutos antes de la administración. La dosificación comienza en la primera administración del Nanocuerpo y continuará a lo largo de ocho semanas de lavado después de la cuarta dosis. Existen catorce administraciones de MTX individuales, separadas por un período de lavado de al menos una semana a partir de la primera administración del artículo de ensayo.

Ejemplo 64: Estudios de fibroblastos derivados del sinovio

En este estudio se evaluó la capacidad de los productos biológicos anti-TNF, ALX0071 y Etanercept, de atenuar la producción de IL inducida por TNF-α por parte de fibroblastos derivados del sinovio.

Aislamiento de fibroblastos sinoviales

El tejido articular sinovial de pacientes RA en consentimiento se conservó en medio basado en DMEM con antibióticos a 4°C durante hasta 96 horas después de la cirugía de reemplazo de articulación. Las células sinoviales se aislaron de sinovio disecado por digestión con colagenasa a 37 °C durante 2 horas. La suspensión celular resultante posteriormente se lavó con una serie de etapas de centrifugación y resuspensión y las células resultantes posteriormente se cultivaron a 37 °C en medio de cultivo basado en DMEM suplementado con 10% de FCS (v/v). Los fibroblastos resultantes se usaron para el siguiente experimento en el segundo o tercer pasaje. Las células de cuatro donadores se usaron en los experimentos individuales. Los fibroblastos se sembraron en placas de poliestireno de parte inferior plana de 96 pocillos a razón de 1,5 x 10⁴ células en un volumen final de 250 µl de medio de cultivo basado en DMEM suplementado con 10% de FCS (v/v) por pocillo y se cultivaron durante toda la noche.

Estimulación de fibroblastos sinoviales

Las células posteriormente se incubaron durante 72 horas en medio de cultivo basado en DMEM suplementado con TNF-α a razón de 50 ng por ml (3 nM (R&D Systems 210-TA/CF) solo o en presencia de dosis crecientes de ALX0071 (0,575 a 1920 ng por ml; 0,015 a 50 50 nM) o Etanercept (Wyeth Labs; 3,75 a 11250 ng por ml; 0,025 a 75 uM). El volumen final en cada pocillo fue 250 µl y cada evaluación se realizó por triplicado. Después de 72 horas, el medio sobrenadante se extrajo y conservó a -40 °C antes del análisis por ELISA IL-6 (R&D Systems). Se determinó la inhibición de la producción de IL-6 inducida por TNF-α y se calcularon los valores de IC50 para ALX0071 y Etanercept.

Síntesis de resultados

Tanto ALX10071 como Etanercept redujeron la producción de IL-6 inducida por TNF-α en forma dependiente de la dosis por parte de los fibroblastos derivados de sinovio RA de los cuatro donadores. Hubo una potencia similar entre los dos reactivos en estas condiciones de ensayo.

Ejemplo 65: Estudios de bolsa de aire murina

En este estudio se evaluó la capacidad de los productos biológicos anti-TNF, ALX10071 y Etanercept, de atenuar la infiltración celular inducida por TNF-α en una bolsa de aire murina.

Creación de bolsa de aire

Las bolsas de aire se formaron por la inyección subcutánea (s.c.) de 2,5 mL de aire estéril en la superficie dorsal de ratones macho C57B1/6/J anestesiados (25-30 g, Harlan). La bolsa se infló por la inyección de 2,5 ml de aire estéril 3 días después.

Estimulación de TNF-α

Seis días después de la creación inicial de la bolsa de aire, los animales se anestesiaron y la bolsa se inyectó con 1 ml de 0,5% de vehículo carboximetilcelulosa (CMC) que contiene 0,1 µg de TNF-α recombinante humano (R & D Systems,

210-TA-050/CF). En tres grupos diferentes de animales, ALX0071 (0,0625, 0,125 y 0,25 mg/kg) se inyectó s.c. 19 horas antes de la inyección de TNF-α. Se inyectaron tres grupos segundos de animales (s.c.) con Etanercept (Wyeth Labs, 0,125, 0,25 y 0,5 mg/kg) inmediatamente antes de la inyección de TNF-α.

24 horas después de la inyección de TNF-α, los ratones se sacrificaron con una concentración creciente de CO₂. Las bolsas se lavaron con 2 ml de PBS estéril libre de endotoxina que contiene 5 UI/ml de heparina. Los volúmenes se registraron y se separaron alícuotas de 0,5 ml para el recuento de la población total de leucocitos (WBC) en un contador de células Sysmex XT-Vet. Se calcularon la media y el error estándar de la media (SEM) de los recuentos WEC totales para cada grupo per ml fluido de lavado extraído. El análisis estadístico fue por ANOVA con pos-prueba Kruskal-Wallis sobre los datos transformados.

10 Síntesis de resultados

Tanto ALX0071 como Etanercept atenuaron la infiltración de WBC inducida por TNF-α en las bolsas de aire (Tabla). Si bien esta atenuación alcanzó valor estadístico en ambos grupos de dosis de ALX0071 0,125 (P<0,01) y 0,25 mg/kg (P<0,05), no se observó significancia estadística con ningún grupo de dosis de Etanercept.

Tabla 8 (PMP1C2 es un nanocuerpo de acuerdo con la invención)

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
PMP1C2 (TNF1)	52	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWYWVVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTA LYYCARSPSGFRGQGTQVTVSS
PMP1G11	53	QVQLQESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFDGVSWMYVVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKTLYLQMNLSLKPEDTA LYYCARSPSGFRGQGTQVTVSS
PMP1H6	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDPSVSWMYVVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLIPEDTA LYYCARSPSGFRGQGTQVTVSS
PMP1G5 (TNF2)	55	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVOLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
PMP1H2	56	QVKLEESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSDYSGYTYTVGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGNTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNNLE PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
PMP3G2	57	AVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSDYSGYTYTVGWFRQAP GKEREFVARIYWSGNTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNNLE PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
PMP1D2	58	AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSAKSVYIMGWFRQAPGK EREFVARIYWSANTYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLMNSLKP EDTAVYYCAARDGIPTSRSVEAYNYWGQGTQVTVSS
PMP3D10	59	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFTGYMGWFRQAPGKERQ LLASISWRGDNITYKESVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNLSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTNWGQGTQVTVSS
PMP5F10 (TNF3)	60	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASGRSLSNYMGWFRQAPGKERE LLGNIWRGNYIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTNWGQGTQVTVSS
PMP6A8 (ALB2)	61	AVQLVESGGGLVQGGSLRLACAASERIFDLNLMGWYRQGPNGERE LVATCITVG.DSTNYADSVKGRFTISM DYTKQTVYLRHMNSLRPEDT GLYYCKIARTWHSSELWGQGTQVTVSS
PMP6B4	62	EVQLVESGGGLVQEGGSLRLACAASERIWDINLLGWYRQGPNGERE LVATITVG.DSTSYADSVKGRFTISR DYDKNTLYLQMNLSLRPEDTG LYYCKIARTWHSSELWGQGTQVTVSS
PMP6A6 (ALB1)	63	AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
PMP6C1	64	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQYPGKEPE WVSSINGRGGDTRYADSVKGRFISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTA EYYCTIGRSVRSRTQGTQVTVSS
PMP6G8	65	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKDQE WVSAISADSSTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLYLEMNSLKPEDTA VYYCVIGRGSPPSPGTQVTVSS

PMP6A5	66	QVQLAESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFGSFGMSWVRQAPGEGLE WVSAISADSSDKRYADSVKGRFTISRDNAKMMLYLEMNSLKSEDTA VYYCVIGRGSFASQGTQVTVSS
PMP6G7	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWYWRVAPGKGLE RISRDI STGGGYSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDT ALYYCAKDREAQVDLDFDYRGQGTQVTVSS
NC55TNF_S1C4	105	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASQII FGSHVAAWFRQAPGRERE FVAEIRPSGDFGPEGEFEHV T ASLKRFTIAKNSVDNTVYLQMNLSL KPEDTAVYYCAAA PYRGGROYRWEY EYEWGQGTQVTV
NC55TNF_S1C3	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKNAGSTSNAYATGWFRAPGKERE FVAGIQWSSGDAFYRNSVKGRFRITRDPDNTVYLQMNLDKPEDTAI YYCAQKLSPPYND FSSNYEYWGQGTQVTV
NC55TNF_S2C1	107	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAVSGQLFSTNDVGVYRRAPGKQRE LVATITDDGTTDYGDVVKGRFVISRREGEMVYLEMNSLKPEDTAVYY CNINRLRSTWGI RYDVWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S2C5	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGETFSTTSMTWVRQAPGKFEE WVSFINSDGSSTTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTA MYYCGRRGYGRDRSKGIQVTVAS
NC55TNF_S3C7	109	EVQLVESGGGTVQAGDSLRLSCAASGRSFSSVAMGWFRQAPGKQRE FLAGVGYDSSIRYAESVKGRFTIARGNRESTVFLQMNENLKPEDTA VYFCTAEPIGAYEGLWYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S3C1	110	XXXXVESGGGLMQPGGSLKLSCAASGFMSDSAMGWFRQAPGKERE FVATISWNGSSSYADFVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNGLTPQDTA IYYCAGSYSNGNPHRF SQYQYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1B2	111	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGTYAMGWFRQAPGKERE FVAASWGGGSIVYAESAKGRFTISRDNAKXTMYLQMDLSLKPEDTA VYYCAAANNIATLRQGSWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1D2	112	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRNFVITYAMSWFRAPGKERE FVASISWSDGTYYSNSVKGRFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTA DYCAVVQVIDPSWSGVNLDYDYLGSQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1E2	113	EVQLVESGGRLVQPGGSLRLSCKNAGSTSNAYATGWFRAPGKERE FVAGIQWSSGDAFYRNSVKGRFRITRDPDNTVYLQMNLDKPEDTAI YYCAQKLSPPYND FSSNYEYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1G2	114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASATISSIVMLGWYRQAPGKQRE WVASITIGSRTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAV YFCNAVPRDDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2A2	115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGQTSSSYDMGWFRQAPGEGRE FVARISGSDGSTYSDRAKDRFTISRDNKNTMNYLQMDRLKPDSTA VYYCRVPRYENQWSSDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2C2	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSTYDMSWVRQAPGKGLE WVSGIDSGGSPMYVDSVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCAKFSTGADGGSWYWSYGMDSWGKGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2F2	117	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASERSNRYNMAWFRQAPGKERE FLARVDVSGGNTLYGDSVKDRFTVSRINGKNAMYLQMNLSLKPEDTA IYYCAAGGWGTTQYDYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC10	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCSVSSGCTFSAYSMTWVRQAPGKA EEWVSFINSDGSSTTYADSVNGRFKISRDNAKKTYLQMNLSLGPED TAMYCQRRGYALDRGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC11	119	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCASSGRGFYKNAMGWFRQPPGKERE FVASIKWNGNNTTYADSVRGRFTISRGNKNTENTVSLQMNLSLKPE DTADYYCAADSSHYVYSKAYEYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC1	120	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVFSGFASFSSMAWVRQAPGKYEE WVSFINSDGSSTTYADSVQGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKSEDTA MYYCGRRGYGRDRSQGIQVTVSS
NC55TNF_NC2	121	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE FVAASWSGTITNYADSVKGRFTISRDNKNTVHLQMNLSLKPEDTA VYHCAVVQPSGGDYTGVEEYDYWGXTQVTVSS

NC55TNE_NC3	122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS GFTFSATSMTWVRQAPGKAE WVSFINSDGSSTTYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMDLQSEDTA MYYCGRRGYGRDRSRGIQVTVSS
NC55TNE_NC5	123	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGAFSNYDVGWFRQAPGEGRE IVARISGSGDSTYSSNRAKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLKREDTA VYYCRAARYNGTWSSNDYWGOGTQVTVSS
NC55TNE_NC6	124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCECVSSGCTFSAYSMTWVRQAPGKA EEFVSFINSDGSSTTYANSVNGRFKISRDN AKKTLYLQMNSLGPED TAMYYCQRRGYALDRGOGTQVTVSS
NC55TNE_NC7	125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQNTVYLMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGOGTQVTVSS
NC55TNE_NC8	126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS GFTFSTTSM TWVRQAPGKFEE WVSFINSDGSSTTYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLMNSLKPEDTA MYYCGRRGYGRDRSKGIQVTVSS
NC55TNE_S2C2	127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGVKVN DMGWFRQAPGKERE LVATITDDGRNTYEDFAKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLLPEDTAV YYCNARTYWAHLPTYWGOGTQVTVSS
NC55TNE_S1C6	128	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFGSVAMGWFRQAPGKERE FVAAIQYDGN SIRYGD SVKGRFTISRDN IKNTMYLEMENLNADDTA RYLCAA EPLARYEGLWTYWGOGTQVTVSS
NC55TNE_S3C2	129	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCTTSTRTNDRENMAWFHQAPGKORE FVSRIDVAGYNTAYGDFVKGRFTVSRDSAENTVVLQMNSLRPEDTG VYYCAAGGWI SOSDYDLWGOGTQVTVSS

Tabla 9

Nanocuerpo	Clase	Koff estimada (1/s)
PMP5 F10	III	2,63E-04
PMP1 G5	II	3,59E-04
PMP1 C2	I	4,39E-04
PMP1 G11	I	1,15E-03
PMP1 H6	I	2,14E-03
PMP1 H2	II	3,65E-03
PMP3 G2	II	1,09E-02

Tabla 10

Nanocuerpo	Secuencia de línea germinal	Diferencias de #AA/ #AA- totales	% de identidad de AA
ALB1	DP51/DP53	13/87	85.1
ALB2	DP54	26/87	70.2
TNF1	DP51/DP53	6/87	93.2
TNF2	DP54	16/87	81.7
TNF3	DP29	18/87	79.4

Tabla 11

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/l)
ALB1	short/37°C	16
ALB2	short/37°C	4
TNF1	short/37°C	8.3
TNF2	short/37°C	5
TNF3	short/37°C	0.8

Tabla 12

ID	50 % de unión (ng/ml)	
	TNF- α humano	TNF- α rhesus
TNF1	12	12
TNF2	20	>3000
TNF3	18	16

Tabla 13

ID	50% de inhibición (mg/ml)	
	TNF- α humano	TNF- α rhesus
TNF1	530	220
TNF2	3500	>5000
TNF3	100	100

Tabla 14

TNF- α humano	Kd (1/s)
TNF1	1,05E-03
TNF2	1,33E-03
TNF3	3,02E-04

Tabla 15

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

Tabla 16

Ensayo: **L929s + Act D (5000c/w)**
 TNF: **TNF- α humana @ 0.5ng/ml**

Nanocuerpo		EC50 en nM			potencia relativa	
		media	desv est	#	media	desv est
TNF1	1C2	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF2	1G5	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF3	5F10	0.224	0.133	14	0.048	0.019
Enbrel		0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira		0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade		0.083	0.037	45	0.103	0.058

Ensayo: **L929s + Act D (5000c/w)**
 TNF: **TNF- α rhesus @ 0.5ng/ml**

Nanocuerpo		EC50 en nM			potencia relativa	
		media	desv est	#	media	desv est
TNF1	1C2	0.693	0.305	9	0.015	0.009
TNF2	1G5	>50		9		
TNF3	5F10	0.602	0.283	9	0.017	0.010
Enbrel		0.009	0.003	7	1	0.000
Humira		0.071	0.025	8	0.103	0.059
Remicade		>6.7		7		

Tabla 17

%	No tratado	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF1	100	98	98	98	98	95	92	90
TNF2	100	99	100	99	97	96	63	50
TNF3	100	96	97	98	96	94	75	70
ALB1	100	101	102	101	100	64	94	90
ALB2	100	100	102	100	100	28	8	17

Tabla 18

Nanocuerpo	temp en °C	EC ₅₀ nM	#	potencia relativa
TNF1	control	0,916	1	0,013
92#2302nr1.TNF1	RT	0,873	1	0,014
	37	0,901	1	0,013
	50	0,908	1	0,013
	60	0,891	1	0,013
	70	1,218	1	0,010
	80	2,655	1	0,004
	90	5,797	1	0,002
TNF2	control	2,500	1	0,005
92#2302nr2.TNF2	RT	2,165	1	0,005
	37	2,212	1	0,005
	50	2,241	1	0,005
	60	1,782	1	0,007
	70	2,487	1	0,005
	80	2,818	1	0,004
	90	6,135	1	0,002
TNF3	control	0,278	1	0,043
92#2302nr3.TNF3	RT	0,289	1	0,041
	37	0,295	1	0,040
	50	0,290	1	0,041
	60	0,281	1	0,042
	70	0,293	1	0,040
	80	0,576	1	0,021
	90	0,861	1	0,014

Tabla 20

ID	Formato	Ligador
TNF4	TNF1-TNF1	9 AA GlySer
TNF5	TNF2-TNF2	9 AA GlySer
TNF6	TNF3-TNF3	9 AA GlySer
TNF7	TNF1-TNF1	30 AA GlySer
TNF8	TNF2-TNF2	30 AA GlySer
TNF9	TNF3-TNF3	30 AA GlySer

Tabla 21

Nanobody [®]	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/l)
TNF4	ON/28°C	3.2
TNF5	corto/37°C	5.5
TNF6	corto/37°C	1.19
TNF7	ON/28°C	2.7
TNF8	corto/37°C	6.6
TNF9	ON/28°C	1.3

Tabla 22

ID	50% de inhibición (mg/l)
	TNF- α humano
TNF4	13
TNF5	6.3
TNF6	30
TNF7	16
TNF8	23
TNF9	18

Tabla 23

Ensayo: **L929s + Act D (5000c/w)**

TNF: **TNF- α humana @ 0.5ng/ml**

Nanocuerpo	EC50 en nM		#	potencia relativa	
	media	desv est		media	desv est
TNF4	0.236	0.049	4	0.033	0.012
TNF5	0.020	0.010	9	0.566	0.275
TNF6	0.078	0.047	8	0.179	0.168
TNF7	0.013	0.005	8	0.673	0.211
TNF8	0.007	0.002	2	1.240	0.137
TNF9	0.012	0.005	6	0.729	0.242
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Ensayo: **L929s + Act D (5000c/w)**

TNF: **TNF- α rhesus @ 0.5ng/ml**

Nanocuerpo	EC50 en nM		#	potencia relativa	
	media	desv est		media	desv est
TNF4	0.141	0.025	4	0.065	0.015
TNF5	35.000	16.000	5	0.000	0.000
TNF6	0.398	0.074	6	0.024	0.003
TNF7	0.011	0.005	4	0.860	0.142
TNF8	1.026	0.444	2	0.010	0.001
TNF9	0.038	0.012	4	0.249	0.032
Enbrel	0.009	0.003	7	1.000	0.000
Humira	0.071	0.025	8	0.103	0.059
Remicade	>6.7		7		

Tabla 24

%	no tratado	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF4	100	99	99	99	98	55	34	17
TNF5	100	99	101	99	98	92	26	22
TNF6	100	103	104	103	105	99	7	7
TNF7	100	100	100	98	96	66	33	40
TNF8	100	99	100	99	100	89	11	8
TNF9	100	101	101	101	101	99	17	18

Tabla 25 TNF13 y TNF14 son nanocuerpos de acuerdo con la invención

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia a
TNF13 (TNF1 HUM1)	76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF14 (TNF1 HUM2)	77	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGLVTVSS
TNF15 (TNF2 HUM1)	78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNLSL PEDTAVYYCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF16 (TNF2 HUM2)	79	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNLSL PEDTAVYYCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF17 (TNF2 HUM3)	80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNLSL PEDTAVYYCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF18 (TNF2 HUM4)	81	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNLSL PEDTAVYYCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF19 (TNF2 HUM5)	82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNLSL PEDTAVYYCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF20 (TNF3 HUM1)	83	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYKDSVKGRFTISRDDSNTIYLQMNLSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF21 (TNF3 HUM2)	84	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYKDSVKGRFTISRDDSNTIYLQMNLSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF22 (TNF3 HUM3)	85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYKDSVKGRFTISRDDSNTIYLQMNLSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF23 (TNF3 HUM4)	86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYKDSVKGRFTISRDDSNTIYLQMNLSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGLTVTVSS
ALB3 (ALB1 HUM1)	87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB4 (ALB1 HUM2)	88	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB5 (ALB1 HUM3)	89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS

Tabla 26

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/l)
TNF13	ON/28°C	8.8
TNF14	ON/28°C	7
TNF15	Short/37°C	7.6
TNF16	Short/37°C	8.7
TNF17	Short/37°C	7.2
TNF18	Short/37°C	4.8
TNF19	Short/37°C	8
TNF20	ON/28°C	3.5
TNF21	ON/28°C	7.5
TNF22	ON/28°C	6
TNF23	ON/28°C	2.8
ALB3	ON/28°C	11.8
ALB4	ON/28°C	9
ALB5	ON/28°C	11.7

Tabla 27

Ensayo: **L929s + Act D (5000c/w)**
TNF : TNF- α humana @ 0.5ng/ml

Nanocuerpo	EC50 en nM		#	potencia relativa	
	media	desv est		media	desv est
TNF1	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
TNF2	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF15	1.669	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	1.898	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	3.023	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	1.508	0.481	4	0.004	0.001
TNF19	2.191	0.941	4	0.001	0.001
TNF3	0.224	0.133	14	0.048	0.019
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.044	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.044	0.011
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 28

%	no tratado	RT	37C	50C	60C	70C	80C	90C
TNF13	100	104	99	98	99	84	93	93
TNF14	100	98	101	95	99	96	99	90
TNF15	100	100	91	99	95	90	59	46
TNF16	100	97	102	101	94	101	58	48
TNF17	100	102	98	100	90	90	69	59
TNF18	100	100	101	97	91	93	63	50
TNF19	100	102	111	98	92	91	60	49
TNF20	100	94	93	93	93	92	85	67
TNF21	100	98	99	101	98	96	36	40
TNF22	100	102	101	105	99	93	25	31
TNF23	100	98	97	99	97	98	87	55
ALB3	100	100	99	98	25	18	60	62
ALB4	100	100	100	100	99	29	61	55
ALB5	100	100	100	99	94	32	61	48

Tabla 29 TNF24, TNF27 y TNF60 son nanocuerpos de acuerdo con la invención

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
TNF1-9GS-ALB1-9GS-TNF1 (TNF24)	90	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTALYYCARS P SGFN R GQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEFEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKLEWVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTALYYCARS P SGFN R GQGTQVTVSS
TNF2-9GS-TNF2-9GS-ALB1 (TNF25)	91	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKEREVARIYWSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKEREVARIYWSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEFEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
TNF3-9GS-ALB1-9GS-TNF3 (TNF26)	92	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNI SWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEFEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNI SWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF1-30GS-TNF1-9GS-ALB1 (TNF27)	93	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTALYYCARS P SGFN R GQGTQVTVSSGGGGSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKLEWVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTALYYCARS P SGFN R GQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEFEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
TNF3-30GS-TNF3-9GS-ALB1 (TNF28)	94	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNI SWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNI SWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEFEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
TNF30-9GS-ALB8-9GS-TNF30 (TNF60)	417	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCARS P SGFN R GQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
TNF33-9GS-ALB8-9GS-TNF33 (TNF62)	418	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASAGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNI SWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASAGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNI SWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS

Tabla 30

ID	Formato,
TNF24	TNF1-9GS-ALB1-9GS-TNF1
TNF25	TNF2-9GS-TNF2-9GS-ALB1
TNF26	TNF3-9GS-ALB1-9GS-TNF3
TNF27	TNF1-30GS-TNF1-9GS-ALB1
TNF28	TNF3-30GS-TNF3-9GS-ALB1

5 **Tabla 31**

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/l)
TNF24	ON/28°C	1.7
TNF25	short/37°C	0.445
TNF26	short/37°C	0.167
TNF27	ON/28°C	2.2
TNF28	short/37°C	1

Tabla 32

Ensayo: **L929s + Act D (5000c/w)**

TNF : TNF- α humano @ 0.5ng/ml

Nanocuerpo	EC50 en nM		#	potencia relativa	
	media	desv est		media	desv est
TNF24	0.011	0.003	11	0.878	0.248
TNF25	0.018	0.008	14	0.603	0.243
TNF26	0.020	0.009	14	0.583	0.210
TNF27	0.012	0.003	3	0.810	0.037
TNF28	0.021	0.008	6	0.548	0.360
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 33

Albúmina humana	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
6A6 (ALB1)	0,57	1,11E+6	6,30E-4
1C2-GS-6A6-GS-1C2 (TNF24)	11	2,26E+05	2,48E-03
1G5-GS-1G5-GS-6A6 (TNF25)	7,2	2,91E+05	2,10E-03
5F10-GS-6A6-GS-5F10 (TNF26)	7,3	2,81E+05	2,05E-03
1C2-GS6-1C2-GS-6A6 (TNF27)	8,9	3,19E+05	2,84E-03
5F10-GS6-5F10-GS-6A6 (TNF28)	14	1,55E+05	2,13E-03

Tabla 34

%	no tratado	RT	37C	50C	60C	70C	80C	90C
TNF24	100	100	99	98	5	3	8	18
TNF25	100	nd	103	102	95	5	4	6
TNF26	100	109	115	112	107	10	8	10
TNF27	100	102	103	102	22	9	26	34
TNF28	100	97	99	99	66	3	6	10

Tabla 35 TNF29 y TNF30 son nanocuerpos de acuerdo con la invención

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
TNF29 (TNF1 HUM1)	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYHMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS
TNF30 (TNF1 HUM2)	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYHMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS
TNF31 (TNF2 HUM1)	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF32 (TNF2 HUM2)	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGLTVTVSS
TNF33 (TNF3 HUM1)	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGRE LLGNI SWRGYNIYKDSVKGRFTISRDDSINTIYLQMNSLRPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGLTVTVSS
ALB6 (ALB1 HUM1)	100	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSS
ALB7 (ALB1 HUM2)	101	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSS
ALB8 (ALB1 HUM3)	102	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSS
ALB9 (ALB1 HUM4)	103	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSS
ALB10 (ALB1 HUM5)	104	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSS

5

Tabla 36

Nanobody™	Tiempo de inducción	Rendimiento
TNF29	ON/28C	2.1 mg/L
TNF30	ON/28C	2.7 mg/L
TNF31	ON/28C	2 mg/L
TNF32	ON/28C	1.5 mg/L
TNF33	ON/28C	0.5 mg/L

Tabla 37

¡ Ensayo: **L929s + Act D (5000c/w)**
TNF : TNF- α humano @ 0.5ng/ml

V _{HH}	EC50 en nM			potencia relativa	
	media	desv est	#	media	desv est
TNF1	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
TNF29	1.336		1	0.013	
TNF30	0.985		1	0.017	
TNF2	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF15	5.896	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	2.422	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	7.555	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	3.134	0.481	4	0.004	0.001
TNF19	7.372	0.941	4	0.001	0.001
TNF31	2.195		1	0.008	
TNF32	2.506		1	0.007	
TNF3	0.224	0.133	14	0.048	0.019
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.004	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.04	0.011
TNF33	0.3		1	0.057	
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 38

	no tratado	RT	37C	50C	60C	70C	80C	90C
TNF29	100	100	100	100	100	96	91	89
TNF30	100	100	100	99	100	98	92	89
TNF31	100	100	100	98	91	84	56	43
TNF32	100	99	98	97	87	78	45	39
TNF33	100	98	97	97	94	91	79	49

Tabla 39

Ensayo: **alphaKYM (10000c/w)**
 TNF : TNF- α humano @ 1ng/ml

Nanocuerpo	EC50 en nM
TNF1	2.466
TNF2	4.236
TNF3	0.655
TNF4	0.069
TNF5	0.008
TNF6	0.121
TNF7	0.009
TNF8	0.013
TNF9	0.020
Enbrel	0.040
Humira	0.103
Remicade	0.100

Resultados de **WO 04/41862**

Nanocuerpo	SEQ ID No	EC50 en nM
1A	1	100
3E	4	12
3G	5	20
Remicade		0,080

Tabla 40

<u>M13 rev</u>	SEQ ID NO: 421	<u>GGATAACNATTTCCACACAGG</u>
<u>Rev 9GlySer L108</u>	SEQ ID NO: 422	<u>TCAGTAACCTGGATCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCAG</u>
<u>For GS/Short</u>	SEQ ID NO: 423	<u>AGGT TACTGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG</u>
<u>Rev 15BspEI L108</u>	SEQ ID NO: 424	<u>TCAGTAACCTTCCGGAACCGCCAACCGCTGAGGAGACGGTGACAAG</u>
<u>For BspEI</u>	SEQ ID NO: 425	<u>AGGT TACTGATCCGGAGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG</u>
<u>M13 for</u>	SEQ ID NO: 426	<u>CACGACGTTGTAAACGAC</u>

Tabla 41

Cebador inverso	SEQ ID	Secuencia
PiRevhumNova40c (NotI)	NO: 427	ATGGTGGTGTGCGGCCCTATTATGAGGAGACGGTGACCAGG
Cebador delantero		
Pi2for (XhoI)	SEQ ID NO: 428	AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

Tabla 42

TNF- α humano	EC50 en nM		Número de ensayos
VRP	media	desv est	
TNF60	0.010	0.002	6
Enbrel	0.014	0.009	33
Humira	0.141	0.074	33
Remicade	0.120	0.037	33

Tabla 43

		albúmina humana	albúmina de rhesus
TNF60	K_D (nM)	24,4	24,1
	k_{on} (1/Ms)	2,05E+05	2,09E+05
	k_{off} (1/s)	5,02E-03	5,04E-03
TNF24	K_D (nM)	11	Nd
	k_{on} (1/Ms)	2,26E+05	Nd
	k_{off} (1/s)	2,48E-03	Nd

Tabla 44

PiForLong	SEQ ID NO: 429	GCTAAAGAGAAGGGCTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGG
Rev_30GlySer_L108	SEQ ID NO: 430	TCAGTAACCTGGATCCCCGCCACCCTGCCCTCCACCCTCCCTACCCCTCCACCCG
For_GlySer	SEQ ID NO: 431	TGCCCTCCACCCCTGAGGAGACGGTGACAAG
PiRevCysIhum	SEQ ID NO: 432	AGGTACTGAGGATCCGGCGGTGGAGGCCAGCGGTGCCGGGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGG
PiRevCysIhum	SEQ ID NO: 433	ATGGTGGTGTGAATCTTATTAGCAGGAGACGGTGACAAGG
AOXIFor	SEQ ID NO: 434	GACTGGTCCCAATTGACAAGC
AOXIRev	SEQ ID NO: 435	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Tabla 45

VEH	TNF- α humano		Número de ensayos
	media	desv est	
TNF1	0.748	0.153	27
TNF55-PEG40	0.004	0.001	8
TNF55-PEG60	0.004	0.002	6
TNF55-Biotine	0.012	0.003	5
TNF56-PEG40	0.006	0.003	57
TNF56-PEG60	0.005	0.003	7
TNF56-Biotine	0.017	0.009	13
Enbrel	0.013	0.006	71
Humira	0.127	0.058	67
Remicade	0.144	0.061	67

Tabla 46

	DS534 P4	DS592 P4	DS605 P3	KM05-179 P4
pIC₅₀				
Etanercept	9.55	9.49	9.51	9.51
Accipiter	9.88	9.44	9.37	9.27
pM				
Etanercept	282	324	309	309
Accipiter	132	363	427	537

Tabla 47

Grupo de dosis	Recuento de WBC total (x10 ⁹ /mL)	
	ALX0071	Etanercept
Vehículo CMC	0.86 ± 0.09	
0.1 μ g human TNF α	3.72 ± 0.21	
0.0625 mg/kg	3.03 ± 0.6	-
0.125 mg/kg	1.23 ± 0.3**	2.40 ± 0.39
0.25 mg/kg	1.37 ± 0.17*	2.47 ± 0.54
0.5 mg/kg	-	2.19 ± 0.10

*p<0.05, **p<0.01 vs 0.1 μ g de TNF- α humana

5 Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de establecer mediante no más que experimentación de rutina muchos equivalentes para las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ablynx N.V.

<120> Nanocuerpos™ mejorados contra el factor de necrosis tumoral alfa

<130> P05-004PCT

5 <160> 435

<110> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

10 <213> -

<220>

<221> característica_miscelánea

<222> (11)..(11)

<223> Residuo marcador

15 <400> 1

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

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

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

20 <213> -

<223>

<221> característica_miscelánea

<222> (2)..(2)

<223> Residuo marcador

25 <220>

<221> característica_miscelánea

<222> (9)..(9)

<223> Residuo marcador

30 <220>

<221> característica_miscelánea

<222> (10)..(10)

<223> Residuo marcador

35 <220>

<221> característica_miscelánea

<222> (12)..(12)

<223> Residuo marcador

<400> 2

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

40 <210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> -

<220>

<221> característica_miscelánea

<222> (21)..(21)
 <223> Residuo marcador

<220>
 <221> característica_miscelánea
 5 <222> (22)..(22)
 <223> Residuo marcador

<400> 3

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

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

<210> 4
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

<220>
 <221> característica_miscelánea
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Residuo marcador

<220>
 <221> característica_miscelánea
 20 <222> (2)..(2)
 <223> Residuo marcador

<220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (6)..(6)
 <223> Residuo marcador

25 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 26
 <212> PRT
 30 <213> -

<400> 5

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

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

<210> 6
 <211> 14
 35 <212> PRT
 <213> -

<400> 6

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

<210> 7
 40 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -

<400> 7

<212> PRT
 <213> -

<400> 14

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

5 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 15

Asp Tyr Trp Met Tyr
 1 5

10 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> -

15 <400> 16

Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly
 1 5 10

20 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 17

Asn Tyr Tyr Met Gly
 1 5

25 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 18

Val Ser Trp Met Tyr
 1 5

30 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> -

<400> 19

Ala His Ser Val Tyr Thr Met Gly
 1 5

35 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 20

Gly Tyr Tyr Met Gly
 1 5

40 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 21

ES 2 384 164 T3

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> -
 5 <400> 21
 Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> -
 <400> 22
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 23
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> -
 <400> 23
 Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 24
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 24
 Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 25
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 30 Gly
 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -
 35 <400> 26

ES 2 384 164 T3

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

Gly

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
5 <213> -

<400> 27

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 28
10 <211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 28

Ser Ile Ser Trp Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Lys Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
15 <211> 15
<212> PRT
<213> -

<400> 29

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

<210> 30
20 <211> 14
<212> PRT
<213> -

<400> 30

Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
25 1 5 10

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> -

<400> 31

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

<210> 32
35 <211> 14
<212> PRT
<213> -

<400> 32

ES 2 384 164 T3

Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn
1 5 10

5 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 33

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

10 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 34

Ser Pro Ser Gly Phe Asn
i 5

15 <210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 35

Ser Pro Ser Gly Ser Phe
1 5

20 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 36

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

25 <210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 30 <400> 37

Leu Asn Leu Met Gly
1 5

35 <210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 38

Ile Asn Leu Leu Gly
1 5

40 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 39

Asn Tyr Trp Met Tyr
1 5

5 <210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 40

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

Gly

10 <210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> -

<400> 41

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

15 <210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> -

<400> 42

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

20 <210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 43

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

25 Gly

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> -

30 <400> 44

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

Gly

35 <210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 45

<210> 52
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -

5 <400> 52

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

<210> 53
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 53

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

<210> 54
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 54

ES 2 384 164 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 Thr Ser Gly Phe Asp Phe Ser Val Ser
 20 25 30

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Ser Phe Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 55
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 55

5

ES 2 384 164 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 85 90 95
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110
 Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 56
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 56

5

ES 2 384 164 T3

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
 50 55 60
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr
 85 90 95
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110
 Val Glu Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

5 <210> 57
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 57

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
 50 55 60
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr
 85 90 95
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110
 Val Glu Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

10 <210> 58
 <211> 127

<212> PRT

<213> -

<400> 58

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

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

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

Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu
100 105 110

Ala Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

<213> -

10

<400> 59

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

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gln Leu Leu
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60

<211> 123

<212> PRT

<213> -

15

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 13 15

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 61
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 61

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 62

ES 2 384 164 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

<210> 63
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 64
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 64

ES 2 384 164 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> 65
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 66

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 67
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 67

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 69
 <211> 30

15

<212> PRT
 <213> -

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

5 <210> 70
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> -

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn
 165 170 175
 Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro
 210 215 220
 Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235

10
 15 <210> 71
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> -

<400> 71

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 85 90 95
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110
 Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr
 165 170 175
 Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 180 185 190
 Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 195 200 205
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu
 210 215 220
 Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265

<210> 72

<211> 255

<212> PRT

<213> -

<400> 72

5

ES 2 384 164 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
 35 40 45
 Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 130 135 140
 Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser
 145 150 155 160
 Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
 165 170 175
 Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr
 180 185 190
 Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys
 195 200 205
 Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly
 225 230 235 240
 Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 245 250 255

<210> 73
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> -

<400> 73

5

ES 2 384 164 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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
 165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val
 245 250 255

Thr Val Ser Ser
 260

<210> 74
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 74

5

ES 2 384 164 T3

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
 165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser
 180 185 190

Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
 195 200 205

Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr
 210 215 220

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys
 225 230 235 240

Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 245 250 255

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val
 260 265 270

Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280 285

<210> 75
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> -

5 <400> 75

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
 35 40 45
 Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser
 165 170 175
 Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln
 180 185 190
 Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly
 195 200 205
 Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 210 215 220
 Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys
 225 230 235 240
 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu
 245 250 255
 Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 260 265 270
 Thr Val Ser Ser
 275

<210> 76
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -

10 <400> 76

ES 2 384 164 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 Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 77
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 77

5

ES 2 384 164 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 Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 78
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 78

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 79
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 79

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 80

<211> 129

<212> PRT

<213> -

<400> 80

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 81

<211> 129

<212> PRT

<213> -

<400> 81

5

10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 85 90 95
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110
 Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 82
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 85 90 95
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110
 Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 83
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 83

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

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 84

<211> 123

<212> PRT

<213> -

5

<400> 84

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

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 85

<211> 123

<212> PRT

<213> -

15

<400> 85

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

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 86

<211> 123

<212> PRT

<213> -

5

<400> 86

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

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87

<211> 115

<212> PRT

<213> -

10

<400> 87

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

<213> -

<400> 88

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 89

<211> 115

<212> PRT

<213> -

<400> 89

5

10

ES 2 384 164 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

<210> 90

<211> 363

<212> PRT

<213> -

<400> 90

5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240

ES 2 384 164 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
260 265 270

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
275 280 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
290 295 300

Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
305 310 315 320

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
325 330 335

Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
340 345 350

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
355 360

<210> 91

<211> 391

<212> PRT

<213> -

<400> 91

5

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr
 165 170 175

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 180 185 190

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 195 200 205

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu
 210 215 220

Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
 245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 275 280 285

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 290 295 300

ES 2 384 164 T3

Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
305 310 315 320

Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
325 330 335

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
340 345 350

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
355 360 365

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
370 375 380

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
385 390

<210> 92

<211> 379

<212> PRT

<213> -

<400> 92

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
 35 40 45
 Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 130 135 140
 Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 145 150 155 160
 Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
 165 170 175
 Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
 180 185 190
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 195 200 205
 Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 245 250 255
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 260 265 270
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
 275 280 285
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
 290 295 300
 Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 305 310 315 320
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
 325 330 335

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 340 345 350

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 370 375

<210> 93

<211> 384

<212> PRT

<213> -

5

<400> 93

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

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

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
 165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val
 245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
 275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser
 290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 340 345 350

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
 355 360 365

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 370 375 380

<210> 94
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 94

5

ES 2 384 164 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu
 35 40 45
 Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser
 165 170 175
 Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln
 180 185 190

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly
 195 200 205

Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 210 215 220

Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys
 225 230 235 240

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu
 245 250 255

Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 260 265 270

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 275 280 285

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
 290 295 300

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser
 305 310 315 320

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile
 325 330 335

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 340 345 350

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 355 360 365

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
 370 375 380

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 385 390 395 400

<210> 95

<211> 115

<212> PRT

<213> -

5

<400> 95

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

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

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 96
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 96

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

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

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 97
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 97

ES 2 384 164 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 Ser Glu Pro
 20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

- <210> 98
- <211> 129
- <212> PRT
- <213> -
- <400> 98

5

ES 2 384 164 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 Ser Glu Pro
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 99

<211> 123

<212> PRT

<213> -

5

<400> 99

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

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100

<211> 115

<212> PRT

<213> -

<400> 100

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
          20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

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

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

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

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

Val Ser Ser
          115

```

5

<210> 101

<211> 115

<212> PRT

<213> -

10

<400> 101

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
          20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

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

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

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

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

Val Ser Ser
          115

```

15

<210> 102

<211> 115

<212> PRT

<213> -

<400> 102

ES 2 384 164 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 Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 103
<211> 115
<212> PRT
<213> -

5

<400> 103

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 104
<211> 115
<212> PRT
<213> -

10

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 105
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 105

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gln Ile Ile Phe Gly Ser His
 20 25 30

Val Ala Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Pro Ser Gly Asp Phe Gly Pro Glu Gly Glu Phe Glu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Pro Tyr Arg Gly Gly Arg Asp
 100 105 110

Tyr Arg Trp Glu Tyr Glu Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 115 120 125

Thr Val
 130

10

<210> 106
 <211> 122
 <212> ?RT
 <213> -

<400> 106

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

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

Ala Thr Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val
 50 55 60

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

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

Gln Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 115 120

<210> 107

<211> 119

<212> PRT

<213> -

5

<400> 107

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

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

Asp Val Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

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

Gly Arg Phe Val Ile Ser Arg Glu Gly Glu Met Val Tyr Leu Glu Met
 65 70 75 80

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

Arg Leu Arg Ser Thr Trp Gly Ile Arg Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 108

<211> 115

<212> PRT

<213> -

10

<400> 108

ES 2 384 164 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 Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr
 20 25 30

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

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

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

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

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ala Ser
 115

<210> 109

<211> 121

5 <212> PRT

<213> -

<400> 109

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

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

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

Ala Gly Val Gly Tyr Asp Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Ala Glu Pro Ile Gly Ala Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 110

<211> 124

<212> PRT

<213> -

<220>

15 <221> característica_misclánea

<222> (1)..(4)

<223> restos de aminoácidos desconocidos, probablemente EVQL, QVQL o una secuencia similar

<400> 110

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Ser Asp Ser
20      25      30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Thr Pro Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85      90      95

Ala Gly Ser Tyr Ser Asn Gly Asn Pro His Arg Phe Ser Gln Tyr Gln
100     105     110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115     120
    
```

5 <210> 111

<211> 120

<212> PRT

<213> -

<220>

10 <221> característica_miscelánea

<222> (77)..(77)

<223> Resto de aminoácido desconocido

<400> 111

```

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Trp Gly Gly Gly Ser Ile Val Tyr Ala Glu Ser Ala
50      55      60

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

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

Ala Ala Ala Asn Asn Ile Ala Thr Leu Arg Gln Gly Ser Trp Gly Gln
100     105     110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115     120
    
```

15 <210> 112

<211> 127

<212> PRT
<213> -

<400> 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Asn Phe Val Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Trp Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ser Asn Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Arg Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Val Val Gln Val Ile Asp Pro Ser Trp Ser Gly Val Asn Leu Asp
100 105 110
Asp Tyr Asp Tyr Leu Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 113
<211> 124
<212> PRT
<213> -

<400> 113

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn Ala Tyr
20 25 30
Ala Thr Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Gln Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

10
15 <210> 114
<211> 115
<212> PRT
<213> -

ES 2 384 164 T3

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Thr Ile Ser Ser Ile Val
20 25 30

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

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

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

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

Ala Val Pro Pro Arg Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 115

<211> 121

<212> PRT

<213> -

5

<400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Arg Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Val Pro Arg Tyr Glu Asn Gln Trp Ser Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116

<211> 127

10

ES 2 384 164 T3

<212> PRT

<213> -

<400> 116

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

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

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

Ser Gly Ile Asp Ser Gly Gly Gly Ser Pro Met Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Phe Ser Thr Gly Ala Asp Gly Gly Ser Trp Tyr Trp Ser Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Ser Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 117

<211> 121

<212> PRT

<213> -

<400> 117

ES 2 384 164 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Arg Ser Ser Asn Arg Tyr
 20 25 30

Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu
 35 40 45

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

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

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

Ala Ala Gly Gly Trp Gly Thr Thr Gln Tyr Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 118

<211> 117

5 <212> PRT

<213> -

<400> 118

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Gln Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Arg Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 119

<211> 129

10 <212> PRT

<213> -

ES 2 384 164 T3

<400> 119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Arg Gly Phe Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Lys Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Glu Asn
 65 70 75 80
 Thr Val Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Ser Ser His Tyr Ser Tyr Val Tyr Ser Lys
 100 105 110
 Ala Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 120
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 120

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 3 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 121

<211> 127

<212> PRT

<213> -

5

<220>

<221> característica_miscelánea

<222> (119)..(119)

<223> Resto de aminoácido desconocido

10

<400> 121

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

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

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

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

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

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

Ala Val Val Gln Pro Tyr Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Glu
 100 105 110

Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 122

<211> 115

<212> PRT

<213> -

15

<400> 122

ES 2 384 164 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 Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 123

<211> 121

<212> PRT

<213> -

<400> 123

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

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

Asp Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Ile Val
35 40 45

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

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

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

Arg Ala Ala Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Ser Ser Asn Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124

<211> 117

<212> PRT

<213> -

<400> 124

ES 2 384 164 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 Glu Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr Phe Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr Cys Gln Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Arg Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 125
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 125

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 126
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 126

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 127
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 127

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ala Ser Gly Val Lys Val Asn
 20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Asp Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Lys
 50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Tyr Trp Ala His Leu Pro Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 128

ES 2 384 164 T3

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

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

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

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

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

Leu Glu Met Glu Asn Leu Asn Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Leu Cys
 85 90 95

Ala Ala Glu Pro Leu Ala Arg Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 129

<211> 121

<212> PRT

<213> -

5

<400> 129

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Thr Arg Thr Asn Asp Arg Phe
 20 25 30

Asn Met Ala Trp Phe His Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Ala Gly Gly Trp Gly Ile Ser Gln Ser Asp Tyr Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 130

<211> 30

10

<212> PRT
<213> -

<400> 130

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

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

5 <210> 131
<211> 30
<212> PRT
<213> -

<400> 131

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

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

10 <210> 132
<211> 30
<212> PRT
<213> -

15 <400> 132

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

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

20 <210> 133
<211> 30
<212> PRT
<213> -

<400> 133

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

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

25 <210> 134
<211> 30
<212> PRT
<213> -

<400> 134

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

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

30 <210> 135
<211> 30
<212> PRT
<213> -

ES 2 384 164 T3

<400> 135

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

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

<210> 136

<211> 30

5 <212> PRT

<213> -

<400> 136

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

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

<210> 137

10 <211> 30

<212> PRT

<213> -

<400> 137

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

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

15 <210> 138

<211> 30

<212> PRT

<213> -

<400> 138

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

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

<210> 139

<211> 30

<212> PRT

<213> -

25 <400> 139

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

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

<210> 140

<211> 30

30 <212> PRT

<213> -

<400> 140

ES 2 384 164 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 Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn
 20 25 30

5 <210> 141
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

<400> 141

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

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

10 <210> 142
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

<400> 142

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

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

15 <210> 143
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

<400> 143

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

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

20 <210> 144
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

<220>

25 <221> característica_miscelánea

<222> (1)..(4)

<223> Resto de aminoácido desconocidos, probablemente EVQL, QVQL o una secuencia similar

<400> 144

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Ser
 20 25 30

30 <210> 145
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

<400> 145

ES 2 384 164 T3

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

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

<210> 146
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 146

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

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

<210> 147
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 147

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn
 20 25 30

<210> 148
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 148

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Thr Ile Ser Ser
 20 25 30

<210> 149
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 149

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

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

25

<210> 150
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 150

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser
 20 25 30
 <210> 151
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> -
 <400> 151
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Glu Arg Ser Ser Asn
 20 25 30
 <210> 152
 <211> 30
 10 <212> PRT
 <213> -
 <400> 152
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr
 20 25 30
 <210> 153
 <211> 30
 15 <212> PRT
 <213> -
 <400> 153
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Arg Gly Phe Tyr
 20 25 30
 20 <210> 154
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 154
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Phe Ser Gly Phe Ala Phe Ser
 20 25 30
 25 <210> 155
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -
 30 <400> 155

ES 2 384 164 T3

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

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

<210> 156
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 156

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

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

<210> 157
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 157

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

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

<210> 158
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 158

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr
 20 25 30

<210> 159
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 159

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

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

25

<210> 160
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 160

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

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

<210> 161
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 161

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ala Ser Gly Val Lys
 20 25 30

<210> 162
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 162

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

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

<210> 163
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 163

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Thr Arg Thr Asn
 20 25

<210> 164
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 164

Asp Tyr Trp Met Tyr
 1 5

25

<210> 165
 <211> 5
 <212> ?RT
 <213> -

30

<400> 165

Val Ser Trp Met Tyr
 1 5

<210> 166
 <211> 5

<212> PRT
 <213> -

<400> 166

Val Ser Trp Met Tyr
1 5

5 <210> 167
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> -

<400> 167

10 **Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly**
1 5 10

<210> 168
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> -

15 <400> 168

Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly
1 5 10

<210> 169
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> -

20 <400> 163

Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly
1 5 10

<210> 170
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> -

25 <400> 170

Ala His Ser Val Tyr Thr Met Gly
1 5

30 <210> 171
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 171

Gly Tyr Tyr Met Gly
1 5

35 <210> 172
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 172

40 **Asn Tyr Tyr Met Gly**
1 5

<210> 173
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 5 <400> 173
 Ser His Val Ala Ala
 1 5
 <210> 174
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> -
 <400> 174
 Ala Tyr Ala Thr Gly
 1 5
 <210> 175
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> -
 <400> 175
 Thr Asn Asp Val Gly
 1 5
 <210> 176
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> -
 <400> 176
 Thr Thr Ser Met Thr
 1 5
 25 <210> 177
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 177
 Ser Val Ala Met Gly
 1 5
 30 <210> 178
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 35 <400> 178
 Asp Ser Ala Met Gly
 1 5
 <210> 179
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> -
 <400> 179

Thr Tyr Ala Met Gly
1 5

5 <210> 180
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 180

Thr Tyr Ala Met Ser
1 5

10 <210> 181
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 181

Ala Tyr Ala Thr Gly
1 5

15 <210> 182
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 182

Ile Val Met Leu Gly
1 5

20 <210> 183
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 183

Ser Tyr Asp Met Gly
1 5

25 <210> 184
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

30 <400> 184

Thr Tyr Asp Met Ser
1 5

35 <210> 185
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 185

Arg Tyr Asn Met Ala
1 5

40 <210> 186
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> -

<400> 186

Phe Ser Ala Tyr Ser Met Thr
1 5

<210> 187

<211> 5

5 <212> PRT

<213> -

<400> 187

Lys Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 188

<211> 5

10 <212> PRT

<213> -

<400> 188

Ala Ser Ser Met Ala
1 5

<210> 189

<211> 5

15 <212> PRT

<213> -

<400> 189

Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 190

<211> 5

20 <212> PRT

<213> -

25 <400> 190

Ala Thr Ser Met Thr
1 3

<210> 191

<211> 5

30 <212> PRT

<213> -

<400> 191

Asn Tyr Asp Val Gly
1 5

<210> 192

<211> 7

35 <212> PRT

<213> -

<400> 192

Phe Ser Ala Tyr Ser Met Thr
1 5

<210> 193

<211> 5

40 <212> PRT

<213> -

<400> 193

Thr Ala Asp Met Gly
 1 5

<210> 194
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> -

<400> 194

Thr Thr Ser Met Thr
 1 5

10 <210> 195
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 195

Val Asn Asp Met Gly
 1 5

15 <210> 196
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -

<400> 196

Ser Val Ala Met Gly
 1 5

20 <210> 197
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> -

25 <400> 197

Asp Arg Phe Asn Met Ala
 1 5

30 <210> 198
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -

<400> 198

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

35 <210> 199
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -

<400> 199

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

40 <210> 200
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -

<400> 200

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

<210> 201

<211> 14

5 <212> PRT

<213> -

<400> 201

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

<210> 202

<211> 14

10 <212> PRT

<213> -

<400> 202

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

<210> 203

<211> 14

15 <212> PRT

<213> -

<400> 203

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

20

<210> 204

<211> 14

<212> PRT

<213> -

25 <400> 204

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

<210> 205

<211> 14

30 <212> PRT

<213> -

<400> 205

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gln Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 206

<211> 14

35 <212> PRT

<213> -

<400> 206

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 207

<211> 14

40 <212> PRT

<213> -

<400> 207

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10

<210> 208

<211> 14

5 <212> PRT

<213> -

<400> 208

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10

<210> 209

<211> 14

10 <212> PRT

<213> -

<400> 209

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

<210> 210

<211> 14

15 <212> PRT

<213> -

<400> 210

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

20

<210> 211

<211> 14

<212> PRT

<213> -

25 <400> 211

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 212

<211> 14

30 <212> PRT

<213> -

<400> 212

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

<210> 213

<211> 14

35 <212> PRT

<213> -

<400> 213

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

<210> 214

<211> 14

40 <212> PRT

<213> -

<400> 214

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 215

<211> 14

5 <212> PRT

<213> -

<400> 215

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 216

<211> 14

10 <212> PRT

<213> -

<400> 216

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

<210> 217

<211> 14

15 <212> PRT

<213> -

<400> 217

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 218

<211> 14

20 <212> PRT

<213> -

<400> 218

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

<210> 219

<211> 14

30 <212> PRT

<213> -

<400> 219

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 220

<211> 14

35 <212> PRT

<213> -

<400> 220

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

<210> 221

<211> 14

40 <212> PRT

<213> -

<400> 221

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

<210> 222

<211> 14

5 <212> PRT

<213> -

<400> 222

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

<210> 223

<211> 14

10 <212> PRT

<213> -

<400> 223

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

15 <210> 224

<211> 14

<212> PRT

<213> -

<400> 224

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

20 <210> 225

<211> 14

<212> PRT

<213> -

25 <400> 225

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Ile Val Ala
 1 5 10

<210> 226

<211> 14

30 <212> PRT

<213> -

<400> 226

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

<210> 227

<211> 14

35 <212> PRT

<213> -

<400> 227

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

<210> 228

40 <211> 14

<212> PRT
 <213> -

<400> 228

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

5 <210> 229
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -

<400> 229

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

10 <210> 230
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -

15 <400> 230

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

20 <210> 231
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 231

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

25 <210> 232
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 232

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

30 <210> 233
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 233

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

35 <210> 234
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

ES 2 384 164 T3

<400> 234

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

Gly

<210> 235

<211> 17

5 <212> PRT

<213> -

<400> 235

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

Gly

<210> 236

10 <211> 17

<212> PRT

<213> -

<400> 236

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

Gly

15 <210> 237

<211> 17

<212> PRT

<213> -

<400> 237

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

20 Gly

<210> 238

<211> 17

<212> PRT

<213> -

25 <400> 238

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 239

<211> 17

30 <212> PRT

<213> -

<400> 239

Ser Ile Ser Trp Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Lys Glu Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 240
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 240

Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 241
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 241

Glu Ile Arg Pro Ser Gly Asp Phe Gly Pro Glu Gly Glu Phe Glu His
 : 5 10 15

Val Thr Ala Ser Leu Lys Gly
 20

<210> 242
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 242

Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 243
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 243

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

25

<210> 244
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 244

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

Gly

ES 2 384 164 T3

<210> 245
<211> 17
<212> PRT
<213> -

5 <400> 245

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

Gly

<210> 246
<211> 17
<212> PRT
<213> -

10

<400> 246

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

Gly

<210> 247
<211> 17
<212> PRT
<213> -

15

<400> 247

Ala Ile Ser Trp Gly Gly Gly Ser Ile Val Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 248
<211> 17
<212> PRT
<213> -

20

<400> 248

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

Gly

<210> 249
<211> 17
<212> PRT
<213> -

25

<400> 249

Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 250
<211> 16

30

ES 2 384 164 T3

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

Gly

5 <210> 256
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 256

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

10 <210> 257
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 257

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

Gly

15 <210> 258
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 258

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

Gly

20 <210> 259
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 259

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

Gly

25 <210> 260
<211> 17
<212> PRT
<213> -

30 <400> 260

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

Gly

<210> 261
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 261

Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 262
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 262

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

Gly

<210> 263
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 263

Thr Ile Thr Asp Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20

<210> 264
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

<400> 264

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

25

Gly

<210> 265
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 265

Arg Ile Asp Val Ala Gly Tyr Asn Thr Ala Tyr Gly Asp Phe Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 266
 <211> 32

<212> PRT
<213> -

<400> 266

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

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

5 <210> 267
<211> 32
<212> PRT
<213> -

<400> 267

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

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

10 <210> 268
<211> 32
<212> PRT
<213> -

<400> 268

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

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

20 <210> 269
<211> 32
<212> PRT
<213> -

<400> 269

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

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

25 <210> 270
<211> 32
<212> PRT
<213> -

<400> 270

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

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

30 <210> 271
<211> 32
<212> PRT
<213> -

<400> 271

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

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

<210> 272
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 272

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

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

<210> 273
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 273

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

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

<210> 214
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 274

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

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

20

<210> 275
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

<400> 275

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

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

25

<210> 276
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 276

Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 1 5 10 15

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

<210> 277

<211> 30

<212> PRT

<213> -

5

<400> 277

Arg Phe Val Ile Ser Arg Glu Gly Glu Met Val Tyr Leu Glu Met Asn
 1 5 10 15

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

<210> 278

<211> 32

<212> PRT

<213> -

10

<400> 273

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

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

<210> 279

<211> 32

<212> PRT

<213> -

15

<400> 279

Arg Phe Thr Ile Ala Arg Gly Asn Arg Glu Ser Thr Val Phe Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 280

<211> 32

<212> PRT

<213> -

20

<400> 280

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

Met Asn Gly Leu Thr Pro Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gly
 20 25 30

<210> 281

<211> 32

<212> PRT

<213> -

25

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (11)..(11)

<223> resto de aminoácido desconocido

30

<400> 281

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

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

<210> 282
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 282

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Arg
 1 5 10 15

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

<210> 283
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 283

Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 1 5 10 15

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

<210> 284
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 284

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

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

<210> 285
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 285

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

Met Asp Arg Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Val
 20 25 30

<210> 286
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

25

<400> 286

30

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

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

<210> 287
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 237

Arg Phe Thr Val Ser Arg Ile Asn Gly Lys Asn Ala Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 288
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 288

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

Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Arg
 20 25 30

<210> 289
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 289

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Glu Asn Thr Val
 1 5 10 15

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

Cys Ala Ala
 35

<210> 290
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 290

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

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

25

<210> 291
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 291

ES 2 384 164 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val His Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 292

<211> 32

<212> PRT

<213> -

5

<400> 292

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

Met Asp Asp Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg
 20 25 30

<210> 293

<211> 32

<212> PRT

<213> -

10

<400> 293

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

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

<210> 294

<211> 32

<212> PRT

<213> -

15

<400> 294

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

Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Arg
 20 25 30

<210> 295

<211> 32

<212> PRT

<213> -

20

<400> 295

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

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

<210> 296

<211> 32

<212> PRT

<213> -

25

<400> 296

30

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

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

<210> 297
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

5

<400> 297

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

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

<210> 298
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 298

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

Met Glu Asn Leu Asn Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Leu Cys Ala Ala
 20 25 30

<210> 299
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 299

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Glu Asn Thr Val Val Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

<210> 300
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 300

Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 1 5

25

<210> 301
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 301

Ser Pro Ser Gly Ser Phe
 1 5

<210> 302
 <211> 6

<212> PRT
 <213> -
 <400> 302
 Ser Pro Ser Gly Ser Phe
 1 5

5 <210> 303
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 303
 Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
 1 5 10 15

10 <210> 304
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 304
 Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr
 1 5 10 15

15 <210> 305
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 305
 Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr
 1 5 10 15

20 <210> 306
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 306
 Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ala Tyr Asn Tyr
 1 5 10 15

25 <210> 307
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 307
 Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn
 1 5 10

30 <210> 308
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 308
 Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 1 5 10

35 <210> 309
 <211> 17

40

<212> PRT
<213> -

<400> 309

Ala Pro Tyr Arg Gly Gly Arg Asp Tyr Arg Trp Glu Tyr Glu Tyr Glu
1 5 10 15

Tyr

5 <210> 310
<211> 16
<212> PRT
<213> -

<400> 310

Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Tyr
1 5 10 15

10 <210> 311
<211> 13
<212> PRT
<213> -

15 <400> 311

Asn Arg Leu Arg Ser Thr Trp Gly Ile Arg Tyr Asp Val
1 5 10

20 <210> 312
<211> 6
<212> PRT
<213> -

<400> 312

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

25 <210> 313
<211> 12
<212> PRT
<213> -

<400> 313

Glu Pro Ile Gly Ala Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr
1 5 10

30 <210> 314
<211> 15
<212> PRT
<213> -

<400> 314

Ser Tyr Ser Asn Gly Asn Pro His Arg Phe Ser Gln Tyr Gln Tyr
1 5 10 15

35 <210> 315
<211> 11
<212> PRT
<213> -

<400> 315

Ala Asn Asn Ile Ala Thr Leu Arg Gln Gly Ser
1 5 10

40

<210> 316
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> -

5 <400> 316

Val Gln Val Ile Asp Pro Ser Trp Ser Gly Val Asn Leu Asp Asp Tyr
 1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 317
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 317

Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Tyr
 1 5 10 15

<210> 318
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 318

Val Pro Pro Arg Asp Asp Tyr
 1 5

<210> 319
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 319

Pro Arg Tyr Glu Asn Gln Trp Ser Ser Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 320
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> -

25

<400> 320

Phe Ser Thr Gly Ala Asp Gly Gly Ser Trp Tyr Trp Ser Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Ser

<210> 321
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 321

Gly Gly Trp Gly Thr Thr Gln Tyr Asp Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 322
 <211> 6

35

<212> PRT
<213> -

<400> 322

Arg Gly Tyr Ala Leu Asp
1 5

5 <210> 323
<211> 17
<212> PRT
<213> -

<400> 323

Asp Ser Ser His Tyr Ser Tyr Val Tyr Ser Lys Ala Tyr Glu Tyr Asp
1 5 10 15

10 **Tyr**

<210> 324
<211> 6
<212> PRT
<213> -

15 <400> 324

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

20 <210> 325
<211> 18
<212> PRT
<213> -

<400> 325

Val Gln Pro Tyr Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Glu Glu Tyr
1 5 10 15

Asp Tyr

25 <210> 326
<211> 6
<212> PRT
<213> -

<400> 326

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

30 <210> 327
<211> 12
<212> PRT
<213> -

<400> 327

Ala Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Ser Ser Asn Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 328
<211> 6
<212> PRT
<213> -

<400> 328

Arg Gly Tyr Ala Leu Asp
1 5

5 <210> 329
<211> 12
<212> PRT
<213> -

<400> 329

Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 330
<211> 6
<212> PRT
<213> -

<400> 330

Arg Gly Tyr Gly Arg Asp
1 5

15 <210> 331
<211> 10
<212> PRT
<213> -

<400> 331

Arg Thr Tyr Trp Ala His Leu Pro Thr Tyr
1 5 10

20 <210> 332
<211> 12
<212> PRT
<213> -

<400> 332

Glu Pro Leu Ala Arg Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr
1 5 10

25 <210> 333
<211> 12
<212> PRT
<213> -

30 <400> 333

Gly Gly Trp Gly Ile Ser Gln Ser Asp Tyr Asp Leu
1 5 10

35 <210> 334
<211> 11
<212> PRT
<213> -

<400> 334

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

40 <210> 335
<211> 11
<212> PRT
<213> -

<400> 335

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

<210> 336

<211> 11

5 <212> PRT

<213> -

<400> 336

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

<210> 337

<211> 11

10 <212> PRT

<213> -

<400> 337

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
. i 5 10

15 <210> 338

<211> 11

<212> PRT

<213> -

<400> 338

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

20 <210> 339

<211> 11

<212> PRT

<213> -

25 <400> 339

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

30 <210> 340

<211> 11

<212> PRT

<213> -

<400> 340

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

35 <210> 341

<211> 11

<212> PRT

<213> -

<400> 341

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

40 <210> 342

<211> 11

<212> PRT
 <213> -
 <400> 342

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

5 <210> 343
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 343

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

<210> 344
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

15 <400> 344

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

<210> 345
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

20 <400> 345

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

<210> 346
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

25 <400> 346

	Arg	Ser	Lys	Gly	Ile	Gln	Val	Thr	Val	Ala	Ser
	1				5					10	

<210> 347
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

30 <400> 347

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

<210> 348
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

35 <400> 348

	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
40	1				5					10	

<210> 349
 <211> 11

<212> PRT
 <213> -

<400> 349

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

5 <210> 350
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

<400> 350

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

10 <210> 351
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

15 <400> 351

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

20 <210> 352
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

<400> 352

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

25 <210> 353
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

<400> 353

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

30 <210> 354
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

<400> 354

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

35 <210> 355
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

<400> 355

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

40

<210> 356
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -
 5 <400> 356
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 357
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> -
 <400> 357
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 358
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> -
 <400> 358
 Arg Ser Gln Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 359
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> -
 <220>
 <221> característica_misclánea
 25 <222> (3)..(3)
 <223> Resto de aminoácido desconocido, probablemente Q
 <400> 359
 Trp Gly Xaa Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 360
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> -
 <400> 360
 Arg Ser Arg Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 35 <210> 361
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 361
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 40 1 5 10
 <210> 362
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -

<400> 362

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

<210> 363

<211> 11

5 <212> PRT

<213> -

<400> 363

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

<210> 364

<211> 11

10 <212> PRT

<213> -

<400> 364

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

<210> 365

<211> 11

15 <212> PRT

<213> -

<400> 365

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

20

<210> 366

<211> 11

<212> PRT

<213> -

25

<400> 366

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

<210> 367

<211> 11

<212> PRT

30

<213> -

<400> 367

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

<210> 368

<211> 30

35 <212> PRT

<213> -

<400> 368

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

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

ES 2 384 164 T3

<210> 369
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -
 5 <400> 369
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Glu Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Trp Asp
 20 25 30
 <210> 370
 <211> 30
 <212> PRT
 10 <213> -
 <400> 370
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg
 20 25 30
 <210> 371
 <211> 30
 <212> PRT
 15 <213> -
 <400> 371
 Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Gly
 20 25 30
 <210> 372
 <211> 30
 <212> PRT
 20 <213> -
 <400> 372
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg
 20 25 30
 <210> 373
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 373
 Gln Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly
 20 25 30
 <210> 374
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> -
 30

<400> 374

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

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

<210> 375

<211> 5

5 <212> PRT

<213> -

<400> 375

Leu Asn Leu Met Gly
 1 5

<210> 376

<211> 5

10 <212> PRT

<213> -

<400> 376

Ile Asn Leu Leu Gly
 1 5

15 <210> 377

<211> 5

<212> PRT

<213> -

<400> 377

Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

20 <210> 378

<211> 5

<212> PRT

<213> -

<400> 378

Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

25 <210> 379

<211> 5

<212> PRT

30 <213> -

<400> 379

Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

35 <210> 380

<211> 5

<212> PRT

<213> -

<400> 380

Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

35 <210> 380

<211> 5

<212> PRT

<213> -

<400> 380

Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

ES 2 384 164 T3

<210> 381
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 5 <400> 381
 Asn Tyr Trp Met Tyr
 1 5
 <210> 382
 <211> 14
 <212> PRT
 10 <213> -
 <400> 382
 Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10
 <210> 383
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> -
 <400> 383
 Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10
 <210> 384
 <211> 14
 20 <212> PRT
 <213> -
 <400> 384
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser
 1 5 10
 25 <210> 385
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 385
 Trp Val Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser
 30 1 5 10
 <210> 386
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -
 35 <400> 386
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val Ser
 1 5 10
 <210> 387
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> -
 <400> 387
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 338
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> -

5 <400> 388

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

<210> 389
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

10

<400> 389

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

Gly

<210> 390
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> -

15

<400> 390

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

<210> 391
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

20

<400> 391

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

Gly

<210> 392
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

25

<400> 392

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

Gly

<210> 393
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -

30

<400> 393

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

Gly

<210> 394
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> -
 5 <400> 394
 Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 395
 <211> 18
 <212> PRT
 10 <213> -
 <400> 395
 Arg Asp Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly
 <210> 396
 <211> 32
 15 <212> PRT
 <213> -
 <400> 396
 Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr Leu His
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile
 20 25 30
 <210> 397
 <211> 32
 20 <212> PRT
 <213> -
 <400> 397
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile
 20 25 30
 25 <210> 398
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 398
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 20 25 30
 30 <210> 399
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> -

<400> 399

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

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

<210> 400

<211> 32

5 <212> PRT

<213> -

<400> 400

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

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

<210> 401

<211> 32

10 <212> PRT

<213> -

<400> 401

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

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

<210> 402

<211> 32

15 <212> PRT

<213> -

<400> 402

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

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

<210> 403

<211> 8

<212> PRT

<213> -

<400> 403

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
 1 5

<210> 404

<211> 8

<212> PRT

<213> -

<400> 404

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
 1 5

<210> 405

<211> 6

<212> PRT
 <213> -
 <400> 405
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5
 5 <210> 406
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 406
 Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser
 1 5
 10 <210> 407
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> -
 15 <400> 407
 Gly Arg Gly Ser Pro
 1 5
 <210> 408
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> -
 <400> 408
 Gly Arg Gly Ser Pro
 1 5
 <210> 409
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> -
 <400> 409
 Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr
 1 5 10
 30 <210> 410
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 410
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 35 <210> 411
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 411
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 40

<210> 412
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -
 5 <400> 412
 Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 413
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> -
 <400> 413
 Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 414
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> -
 <400> 414
 Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 415
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> -
 <400> 415
 Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 25 <210> 416
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 416
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 30 <210> 417
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> -
 35 <400> 417

ES 2 384 164 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 Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125

 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 130 135 140

 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160

 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
 165 170 175

 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190

 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205

 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
 210 215 220

 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255

ES 2 384 164 T3

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
260 265 270

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
275 280 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
290 295 300

Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
305 310 315 320

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
325 330 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
340 345 350

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
355 360

<210> 418

<211> 379

<212> PRT

<213> -

<400> 418

5

ES 2 384 164 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 Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
 35 40 45
 Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 130 135 140
 Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 145 150 155 160
 Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
 180 185 190
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 195 200 205
 Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 245 250 255
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr
 275 280 285
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu
 290 295 300
 Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 305 310 315 320

ES 2 384 164 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
340 345 350

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 419

<211> 260

<212> PRT

<213> -

5

<400> 419

ES 2 384 164 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 Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
 165 170 175
 Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 180 185 190
 Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
 210 215 220
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val
 245 250 255
 Thr Val Ser Cys
 260

<210> 420
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> -
 <400> 420

5

ES 2 384 164 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 Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp
 165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val
 245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Cys
 260

<210> 421
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> -

<400> 421

ggataacaat ttcacacagg 20

<210> 422
 <211> 55

ES 2 384 164 T3

<212> DNA
 <213> -
 <400> 422
 tcagtaacct ggatccgccca ccgctgcctc caccgcctga ggagacgggtg accag 55
 5 <210> 423
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> -
 <400> 423
 10 aggttactga ggatccgagg tgcagctggt ggagtctgg 39
 <210> 424
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> -
 15 <400> 424
 tcagtaacct tccggaaccg ccaccgcctg aggagacgggt gacaag 46
 <210> 425
 <211> 48
 <212> DNA
 20 <213> -
 <400> 425
 aggtcactga tccggaggcg gtagcgaggt gcagctggtg gagtctgg 48
 <210> 426
 <211> 19
 25 <212> DNA
 <213> -
 <400> 426
 caccgacgttg taaaacgac 19
 <210> 427
 30 <211> 43
 <212> DNA
 <213> -
 <400> 427
 atggtggtgt gcggccgcct attatgagga gacggtgacc agg 43
 35 <210> 428
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> -
 <400> 428
 40 aggggtatct ctcgagaaaa gagaggtgca gctggtggag tctgg 45
 <210> 429
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> -
 45 <400> 429
 gctaaagaag aaggggtatc tctcgagaaa agagaggtgc agctggtgga gtctgg 56

ES 2 384 164 T3

<210> 430
 <211> 88
 <212> DNA
 <213> -
 5 <400> 430
 tcagtaacct ggatcccccg ccaccgctgc ctccaccgcc gctaccccag ccaccgctgc **60**
 ctccaccgcc tgaggagacg gtgacaag **88**
 <210> 431
 <211> 69
 <212> DNA
 10 <213> -
 <400> 431
 aggttactga ggatcccgcg gtggaggcag cggtgccggg ggtagcgagg tgcagctggt **60**
 ggagtctgg **69**
 <210> 432
 <211> 41
 15 <212> DNA
 <213> -
 <400> 432
 atggtggtgt gaattcttat tagcaggaga cggtgacaag g 41
 <210> 433
 <211> 53
 20 <212> DNA
 <213> -
 <400> 433
 atggtggtgt gaattcttat tagcaacctc cacctgagga gacggtgaca agg 53
 25 <210> 434
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> -
 <400> 434
 30 gactggtcc aattgacaag c 21
 <210> 435
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> -
 35 <400> 435
 gcaaatggca ttctgacatc c 21

REIVINDICACIONES

1. Un nanocuerpo contra TNF-alfa que comprende cuatro regiones estructurales (FR1 a FR4) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3), en el que:
- A) i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- 5 ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y
- iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- B) i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- 10 ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y
- iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN, en la que dicho nanocuerpo tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células por medio de las células KYM que se describen en el Ejemplo 1, bajo 3) del documento de WO 04/041862 que es mejor que 5 nM.
- 15 2. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY.
3. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
4. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 20 5. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 25 CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
6. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 30 7. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
8. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en que:
- CDR1 tiene una diferencia de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos DYWMY, dicha diferencia es una sustitución conservadora de aminoácido;
- 35 CDR2 tiene una o dos diferencias de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG, dicha diferencia es sustitución conservadora de aminoácido(s); y/o
- CDR3 tiene una diferencia de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos SPSGFN, dicha diferencia es a sustitución conservadora de aminoácido.
9. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- 40 10. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
11. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
12. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 45 CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos EINTNGLI

TKYPDSVKG; o

CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- 5 13. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
14. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYP@SVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
15. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que es un nanocuerpo humanizado.
- 10 16. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que es un nanocuerpo clase GLEW en el que la secuencia de aminoácidos en las posiciones 44-47 de acuerdo con la numeración de Kabat se selecciona del grupo que consiste en GLEW, GVEW, EPEE/, GLER, DGEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER y ELFIN,
17. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- 15 18. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29), y 96 (TNF30).
19. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una de las secuencias de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29), y 96 (TNF30).
- 20 20. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con una de las secuencias de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs 52 (TNF1), 75 (TNF1 3), 77 (TNF14), 95 (TNF29), y 96 (TNF30).
21. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con una de las secuencias de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29), y 96 (TNF30).
- 25 22. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21 que contiene un residuo de leucina (1) en la posición 108.
23. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que el nanocuerpo se elige del grupo que consiste en TNF 13 (SEQ ID NO: 76), TNF 14 (SEQ ID NO: 77), TNF 29 (SEQ ID NO: 95), y TNF 30 (SEQ ID NO: 96).
- 30 24. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las 1-23 que es TNF 30 (SEQ ID NO: 96).
25. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, que es una variante humanizada de un nanocuerpo no humanizado contra TNF-alfa, tal nanocuerpo no humanizado contra TNF-alfa tiene las siguientes secuencias estructurales: FR1: SEQ ID NO: 130; FR2: SEQ ID NO: 196; FR3: SEQ ID NO: 266; y FR4: SEQ ID NO: 334.
- 35 26. El nanocuerpo de acuerdo con la reivindicación 25, que se dirige contra el mismo epítipo de TNF como TNF1 (SEQ ID NO: 52).
27. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en el que el nanocuerpo se dirige contra el mismo epítipo en el trímero de TNF-alfa como nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52).
- 40 28. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en el que el nanocuerpo se dirige contra el mismo epítipo de trímero de TNF-alfa como nanocuerpo TNF3 (SEQ ID NO: 60).
29. El nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que el nanocuerpo es una variante humanizada del nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52).
30. Un polipéptido que comprende al menos un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29.
- 45 31. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el polipéptido consiste esencialmente en un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29.
32. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el polipéptido comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29.

33. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 32 que comprende dos nanocuerpos TNF30 (SEC) ID NO: 96).
34. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 32 o 33, que después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir el entrecruzamiento del receptor TNF que está mediado por dicho trímero TNF y/o la transducción de señales que está mediada por tal entrecruzamiento del receptor.
- 5 35. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 32 o 33, en el que el polipéptido es capaz de unirse en forma intramolecular a al menos dos sitios de unión del receptor TNF en un trímero TNF.
36. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en el que los dos nanocuerpos se unen directamente entre sí.
- 10 37. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en el que los dos nanocuerpos se unen directamente entre sí por medio de un ligador.
38. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 37, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos.
39. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 38, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 14 aminoácidos.
- 15 40. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 38, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 17 aminoácidos.
41. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 38, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos que comprende 20 a 40 aminoácidos.
42. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-41, el que el ligador comprende residuos de glicina y serina.
- 20 43. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32-42, que comprende el polipéptido TNF 7 (SEQ ID NO: 73), en que los nanocuerpos TNF 1 se han humanizado.
44. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32-43, que comprende el polipéptido TNF 55 (SEQ ID NC: 419) o TNF 56 (SEC ID NO: 420).
45. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-44, en el que el polipéptido está pegilado.
- 25 46. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-43, que además comprende al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
47. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 46, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana tiene las secuencias de CDR presentes en la ALB 8 (SEQ ID NO: 102).
- 30 48. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende dos nanocuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29 y que además comprende al menos un nanocuerpo dirigido contra la albúmina sérica humana.
49. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 48, en el que los dos nanocuerpos contra TNF se unen directamente al nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
50. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 48, en el que los dos nanocuerpos contra TNF se unen al nanocuerpo dirigido contra la albúmina sérica humana por medio de un ligador.
- 35 51. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 50, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos.
52. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 50 o 51, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos que comprende 3 a 40 aminoácidos.
53. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 50 o 51, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos que comprende 5 a 15 aminoácidos.
- 40 54. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 50 o 51, en el que el ligador comprende residuos de glicina y serina.
55. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46-54, en el que al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana tiene las secuencias de CDR presentes en la ALB 8 (SEQ ID NO: 102).
56. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-55, en el que al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.
- 45 57. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 56, en el que al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

58. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 56, en el que al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 8 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103), y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).
- 5 59. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 58, en el que al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8 (SEQ ID NO: 102).
60. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 48-58, que comprende dos nanocuerpos que son variantes humanizadas de un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29 y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).
- 10 61. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-60, en que ambos el nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52) así como el nanocuerpo ALB I (SEQ ID NO: 63) se ha humanizado.
62. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-61, que comprende dos nanocuerpos TNF 30 (SEQ ID NO: 96) y un Nanocuerpo ALB 8 (SEQ ID NO: 102).
- 15 63. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-62, que comprende el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).
64. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48-62, que consiste en el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).
65. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el polipéptido tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).
- 20 66. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el polipéptido tiene al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).
67. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el polipéptido tiene al menos 95% de identidad de secuencia con el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).
- 25 68. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el polipéptido tiene al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).
69. Un ácido nucleico que comprende: (a) un ácido nucleico que codifica un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29; o (b) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-68.
70. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 69.
- 30 71. Una célula huésped que es capaz de expresar: (a) un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29; o (b) un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-68.
72. Un procedimiento para preparar un nanocuerpo, que comprende cultivar o mantenimiento de una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 70 o 71 en condiciones tales que dicha célula huésped produce un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29; o en condiciones tales que dicha célula huésped produce un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-68.
- 35 73. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 72, que además comprende aislar el nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29.
74. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 72, que además comprende aislar el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-68.
- 40 75. Una composición farmacéutica, que comprende (a) al menos un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable; o (b) al menos un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-68, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 76. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 75, que comprende al menos un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable, para usar en el tratamiento de al menos una enfermedad seleccionada de inflamación, artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, Diabetes Tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, Lupus eritematoso sistémico, Infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, y vasculitis.
- 50

- 5 77. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 75, que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-68, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable, para usar en el tratamiento de al menos una enfermedad seleccionada de inflamación, artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, diabetes Type 1, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, fertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, y vasculitis.
- 10 78. Uso de (a) un nanocuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29; o (b) a polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-68 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de al menos una enfermedad seleccionada de inflamación, artritis reumatoide, COPD, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome intestinal inflamatorio, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, Diabetes Type 1, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, Lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, esclerosis múltiple,
- 15 miastenia gravis, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren. espondiloartropatías, tiroiditis, y vasculitis

PMP1C2	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGFTFS D....YWHY wvrqapqkgl	class I
PMP1G11	qvqlqesqgg avqpggsrlrl scaasGFDFG V....SWHY wvrqapqkgl	
PMP1H6	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGFDFG V....SWHY wvrqapqkgl	
PMP3D10	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGRSFT G....YTHG wfrqapqker	class III
PMP5F10	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasCRSLG N....YTHG wfrqapqker	
PMP1G5	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGRFTFS EPSGYTYTIG wfrqapqker	class II
PMP1H2	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGRFTFS DYSGYTYTVG wfrqapqker	
PMP3G2	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGRFTFS DYSGYTYTVG wfrqapqker	
PMP1D2	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGRFTFS AHSV..YTHG wfrqapqker	class IIB
PMP1C2	ewvseINTNG LITKYFDSVK Grftisrdna kntlylqms lkpedtalyy	
PMP1G11	ewvseINTNG LITKYFDSVK Grftisrdna kntlylqms lkpedtalyy	
PMP1H6	ewvseINTNG LITRYVDSVK Grftisrdna kntlylqms lkpedtalyy	
PMP3D10	qllasISWRG DNTYYKESVK Grftisrdda kntlylqms lkpedtavyy	
PMP5F10	ellgnISWRG YNIYYKDSVK Grftisrdda kntlylqms lkpedtavyy	
PMP1G5	efvarIYWSS GLTYYADSVK Grftisrdia kntvdllms lkpedtavyy	
PMP1H2	efvarIYWSS GNTYYADSVK Grftisrdia kntvdllms lkpedtavyy	
PMP3G2	efvarIYWSS GNTYYADSVK Grftisrdia kntvdllms lkpedtavyy	
PMP1D2	efvarIYWSS ANTYYADSVK Grftisrdna kntvdllms lkpedtavyy	
PMP1C2	caas..... ..PSGFNrg qgtqvtvss	
PMP1G11	caas..... ..PSGSFrg qgtqvtvss	
PMP1H6	caas..... ..PSGSFrg qgtqvtvss	
PMP3D10	caas.LLPLS DDPGWNTNwg qgtqvtvss	
PMP5F10	caas.LLPLS DDPGWNTYwg qgtqvtvss	
PMP1G5	caasRDGIPTS RSVGSYNYwg qgtqvtvss	
PMP1H2	caasRDGIPTS RSVGSYNYwg qgtqvtvss	
PMP3G2	caasRDGIPTS RSVGSYNYwg qgtqvtvss	
PMP1D2	caasRDGIPTS RSVESYNYwg qgtqvtvss	

Figura 1

Hum+, Rhe+, Mou+ > PMP6G8	avqlvesqgg lvqpggsrlrl tctasGFTFR SFGHSwvrqa pqkqewvsa A
Hum+, Rhe+, Mou+ > PMP6A5	avqlaesqgg lvqpggsrlrl tctasGFTFG SFGHSwvrqa pqeglewsa
Hum+, Rhe+, Mou+ > PMP6A6	avqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGFTFR SFGHSwvrqa pqkepevvs B
Hum+, Rhe+, Mou+ > PMP6C1	avqlvdsqgg lvqpggsrlrl scaasGFSPG SFGHSwvrqa pqkepevvs
Hum+, Rhe+, Mou+ > PMP6A8	avqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasERIFB LNLGwyrq pqnereivat C
Hum+, Rhe+, Mou+ > PMP6B4	avqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasERIFD LNLGwyrq pqnereivat
Hum+, Rhe-, Mou- > PMP6G7	qvqlvesqgg lvqpggsrlrl scaasGRFTFS NYWHYwvrva pqkqerier D
PMP6G8	ISADSSSTRNY ADSVKGrfti srdnakkmy lemslkped tavyyeviGR
PMP6A5	ISADSSBRRY ADSVKGrfti srdnakkmy lemslkped tavyyeviGR
PMP6A6	ISGSGSDTLY ADSVKGrfti srdnaktly lqmslkped tavyyctiGG
PMP6C1	INRGGDDTRY ADSVKGrfti srdnaxntly lqmslkped tavyyctiGR
PMP6A8	ITVG.DSTNY ADSVKGrfti smdytkqvty lqmslrped tqlyyckiRR
PMP6B4	ITVG.DSTSY ADSVKGrfti srdydkntly lqmslrped tqlyyckiRR
PMP6G7	ISTGGGYSY ADSVKGrfti srdnaktly lqmslkped talyycakDR
PMP6G8	GSPs..... ..spqtqvty ss
PMP6A5	GSPs..... ..sqqtqvty ss
PMP6A6	SLSRs..... ..sqqtqvty ss
PMP6C1	SVRS..... ..rtqqtqvty ss
PMP6A8	TWSEL.... ..sqqtqvty ss
PMP6B4	TWSEL.... ..sqqtqvty ss
PMP6G7	EAQVDTLDFD Yrgqqtqvty ss

Figura 2

Detección de nanocuerpos específicos de albúmina versus SA humano

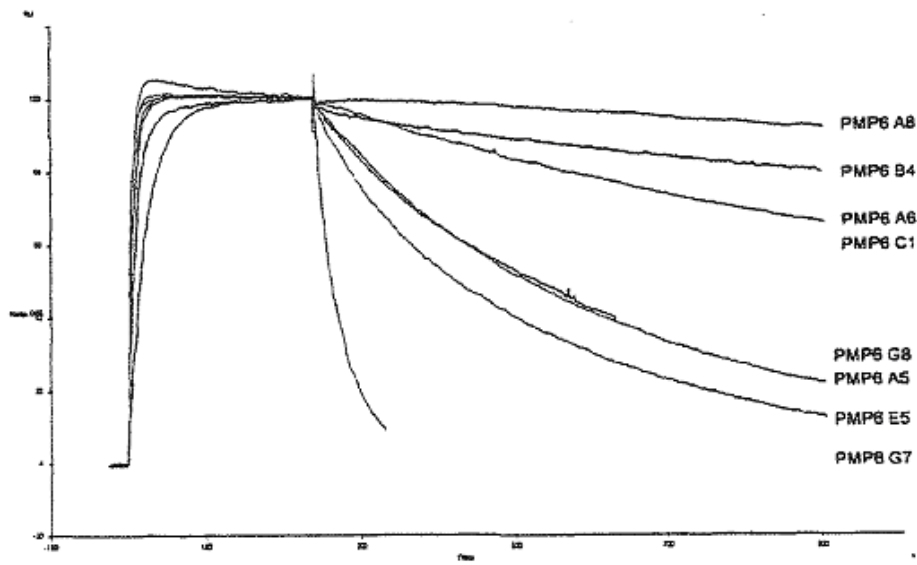


Figura 3

Detección de nanocuerpos específicos de albúmina versus SA rhesus

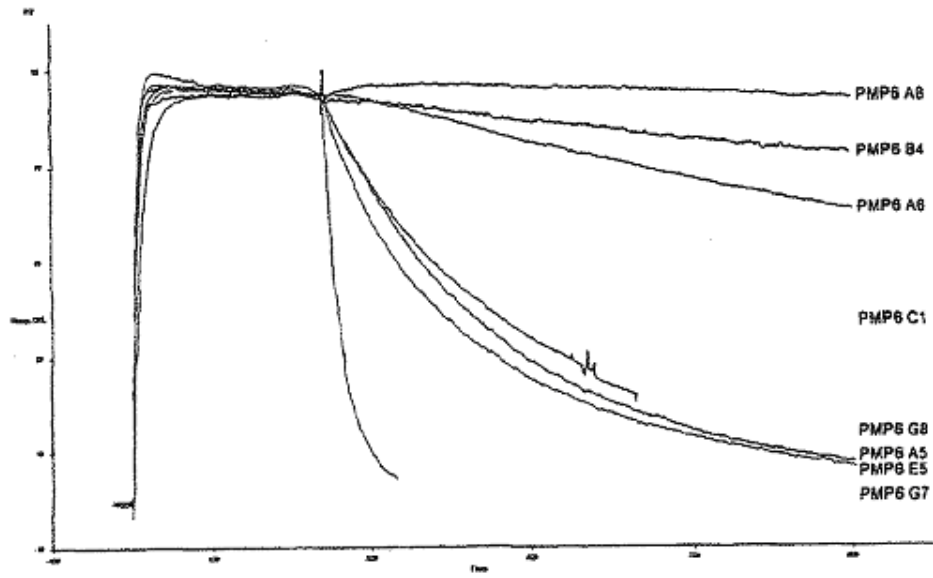


Figura 4

Detección de nanocuerpos específicos de albúmina versus SA de monos

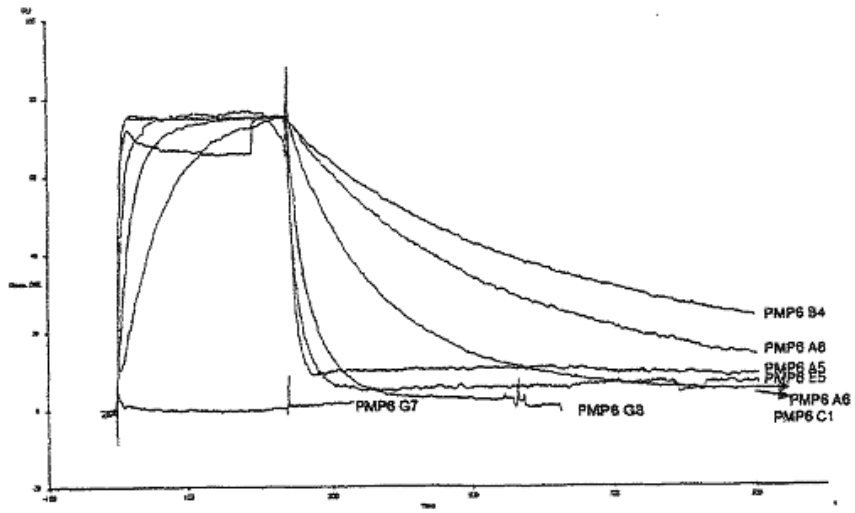


Figura 5

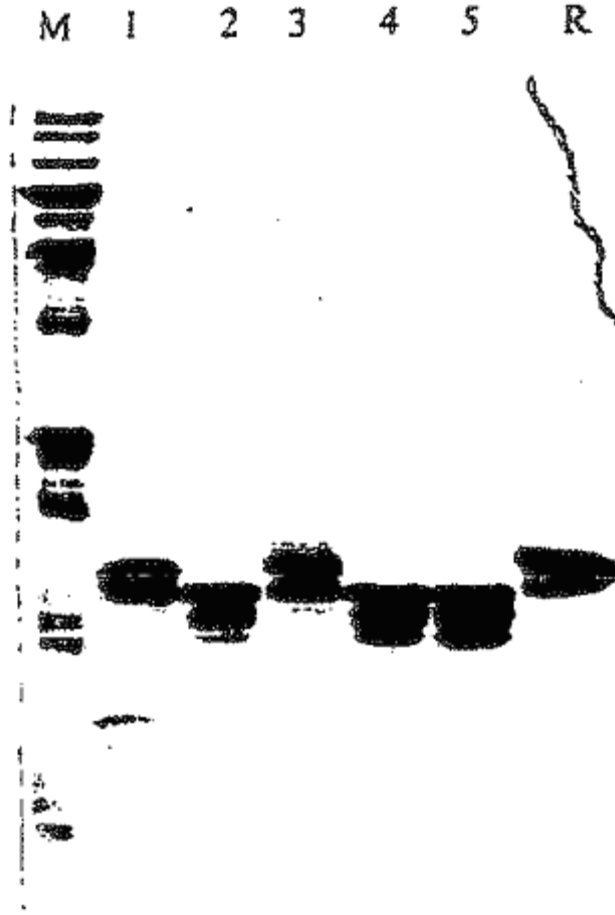


Figura 6

Anti-myc

R 5 4 3 2 1



1: TNF2
2: TNF1
3: TNF3
4: ALB1
5: ALB2
R: 100ng de nanocuerpo de referencia

Anti-Nanocuerpo

R 5 4 3 2 1



Figura 7

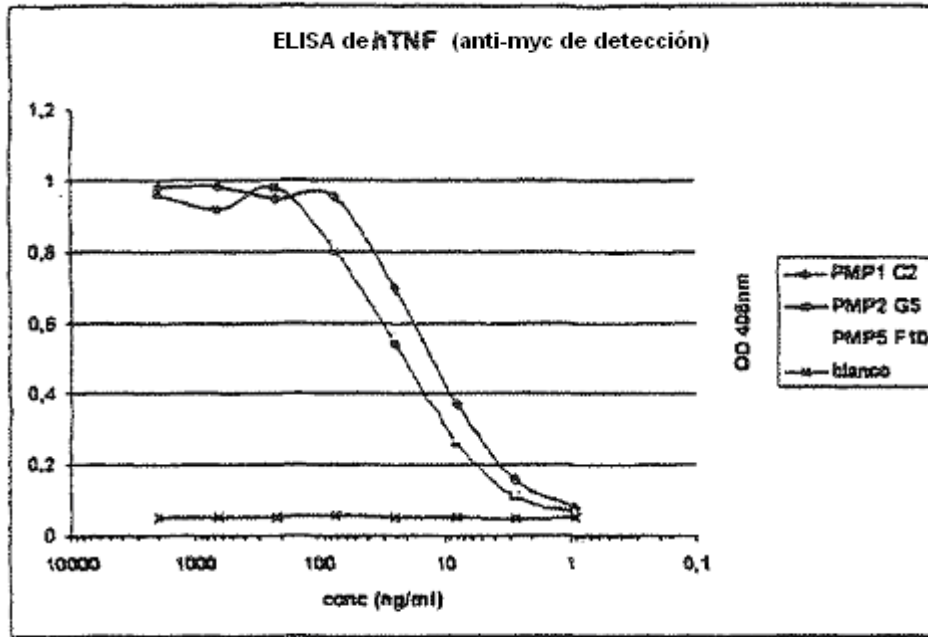


Figura 8

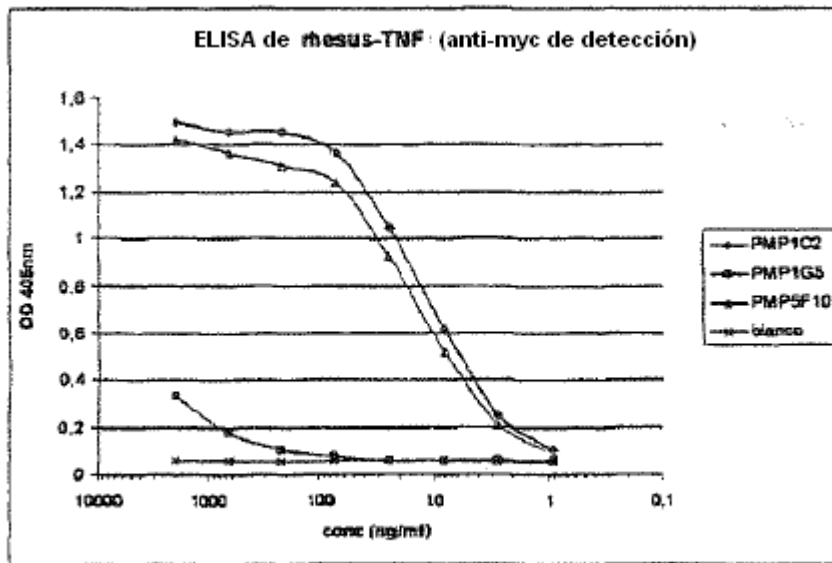


Figure 9

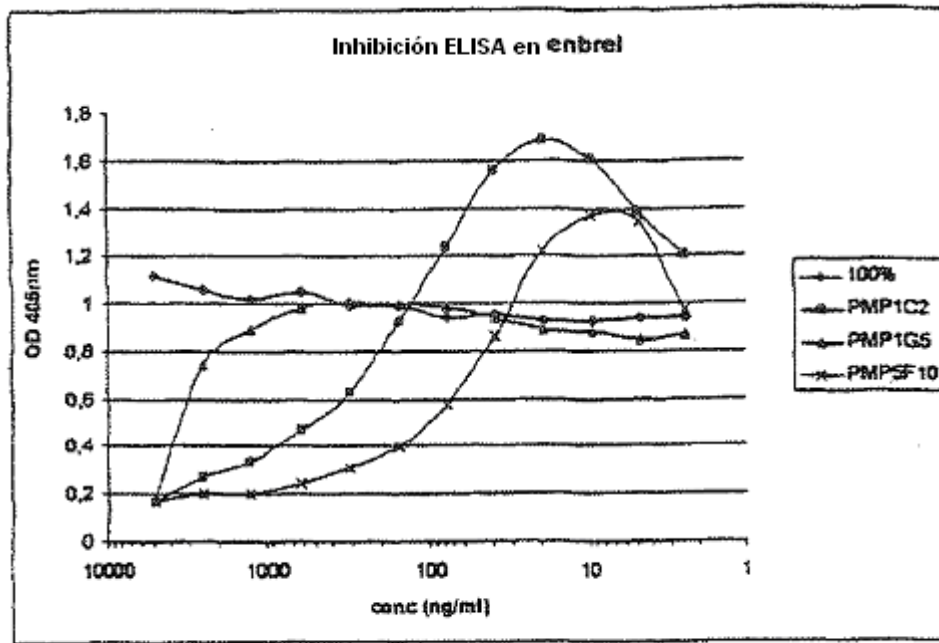


Figura 10

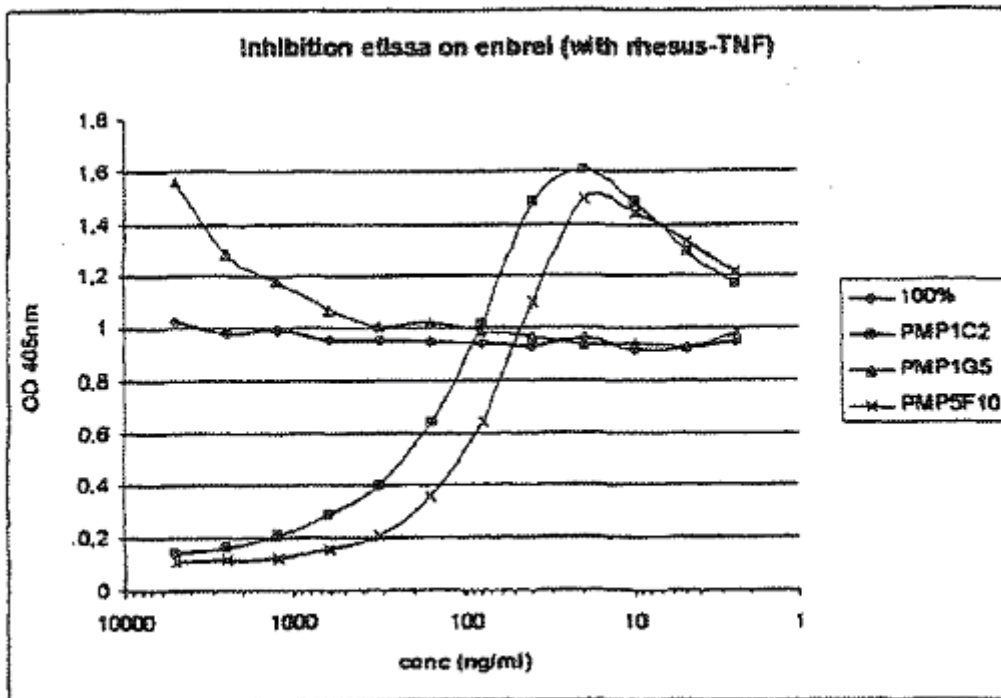


Figura 11

PMP1 C2, PMP1 G5 & PMP5 F10 versus TNF humano (datos normalizados)

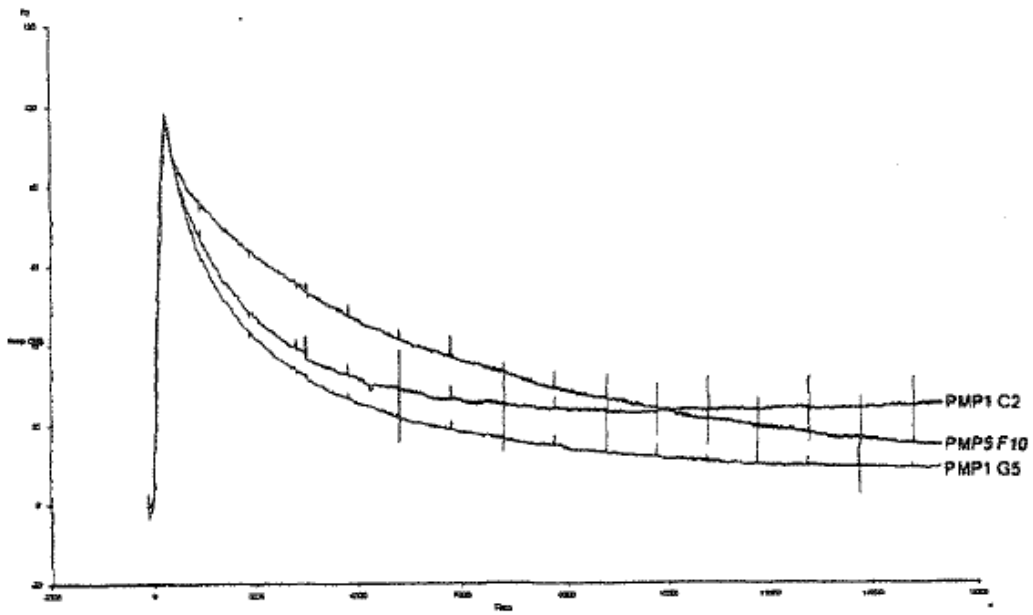


Figura 12

PMP1 C2, PMP1 G5 & PMP5 F10 versus TNF de rhesus (datos normalizados)

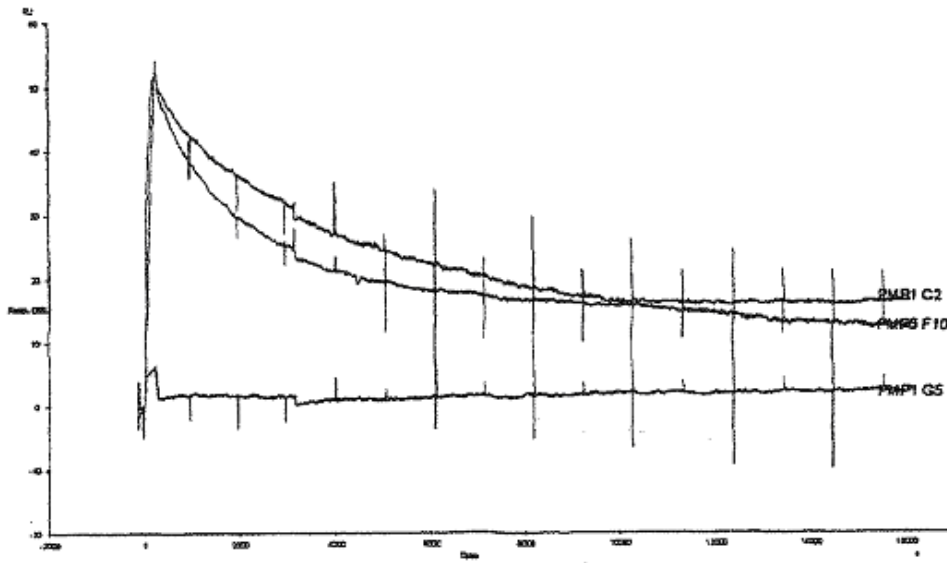


Figura 13

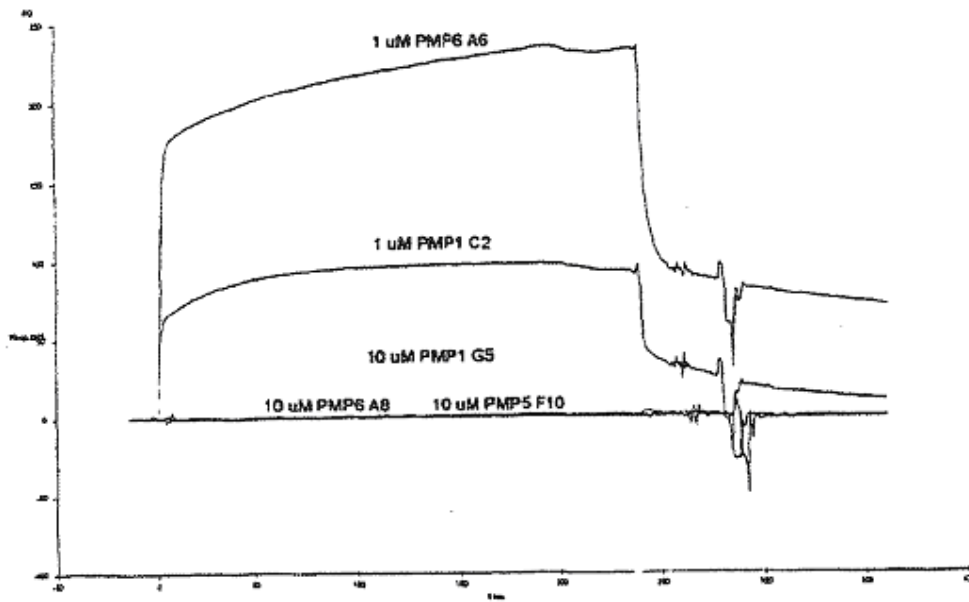


Figura 14

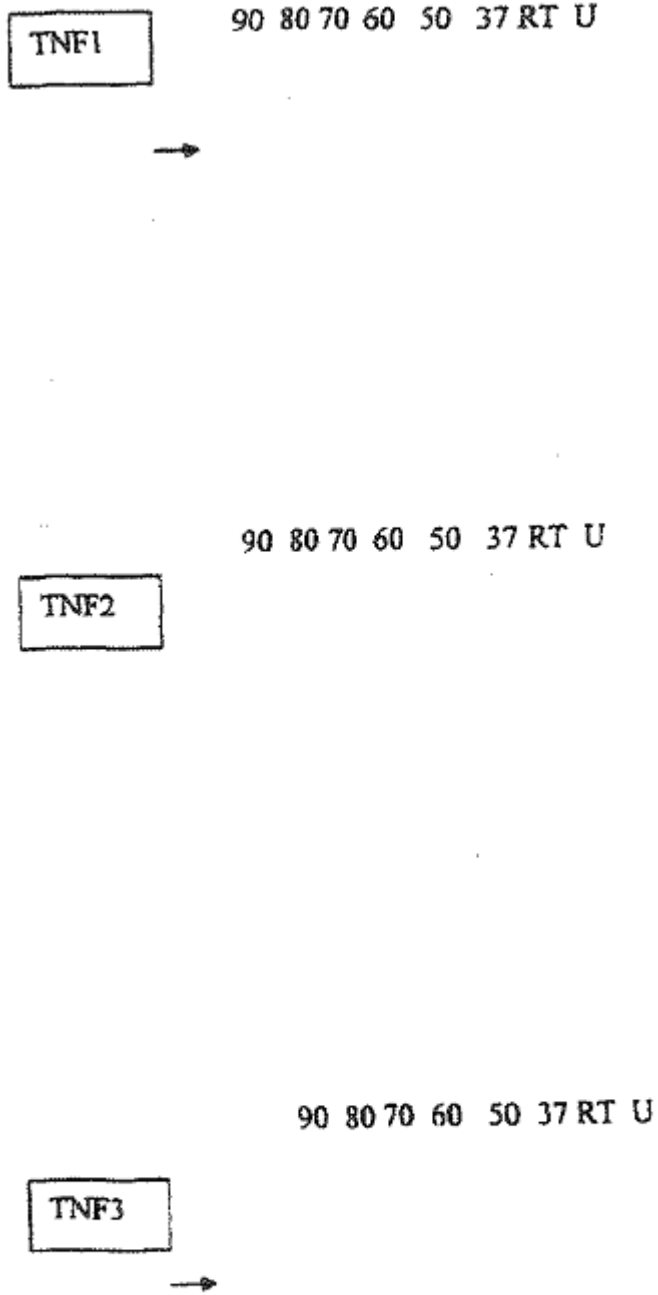


Figura 15

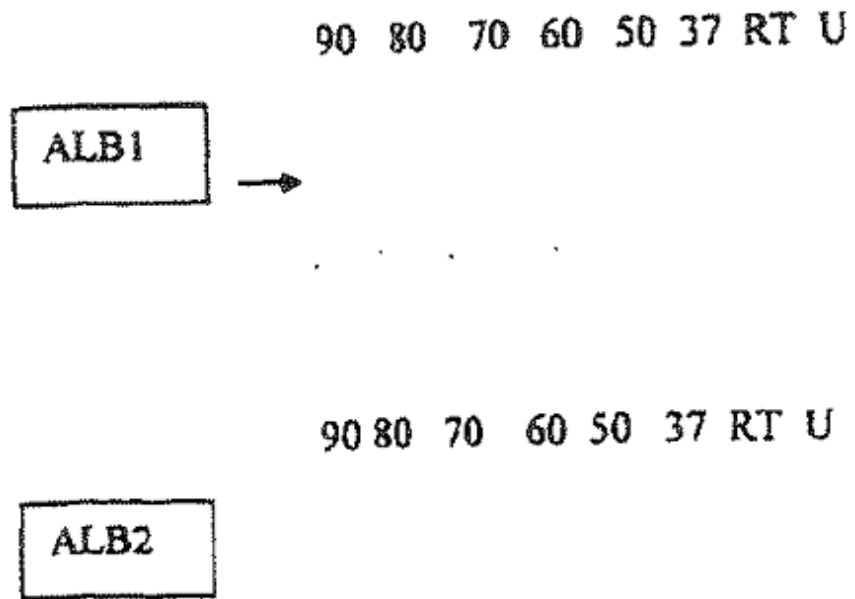


Figura 15 - continuación

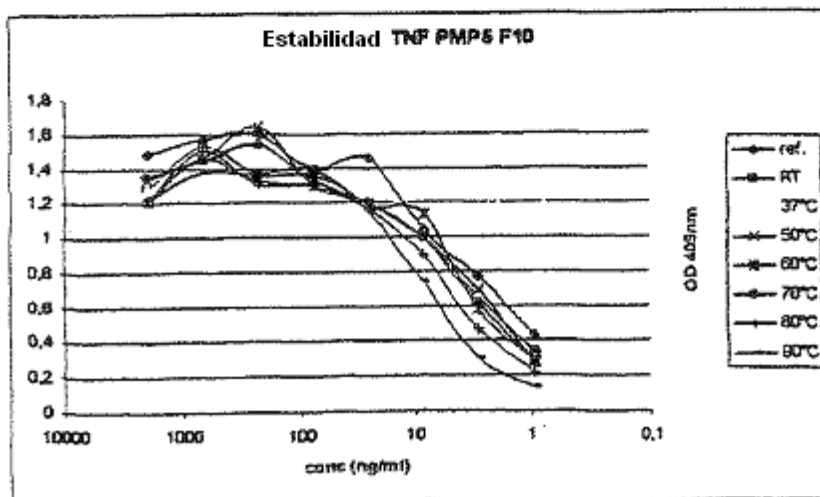
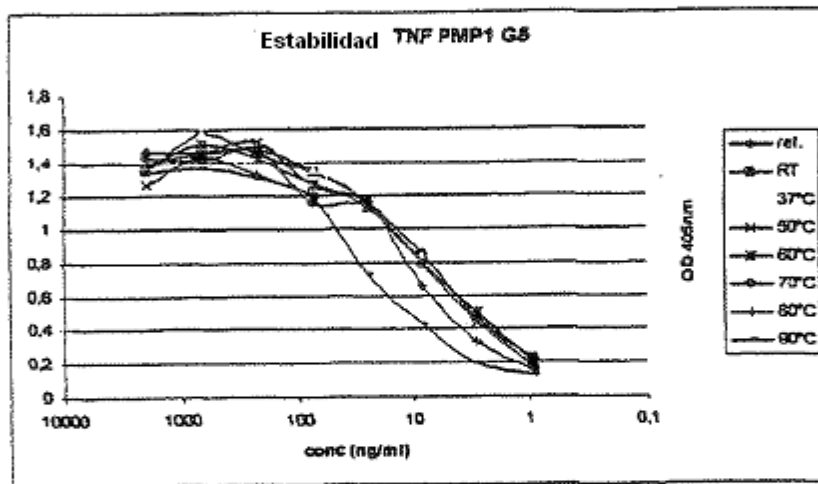
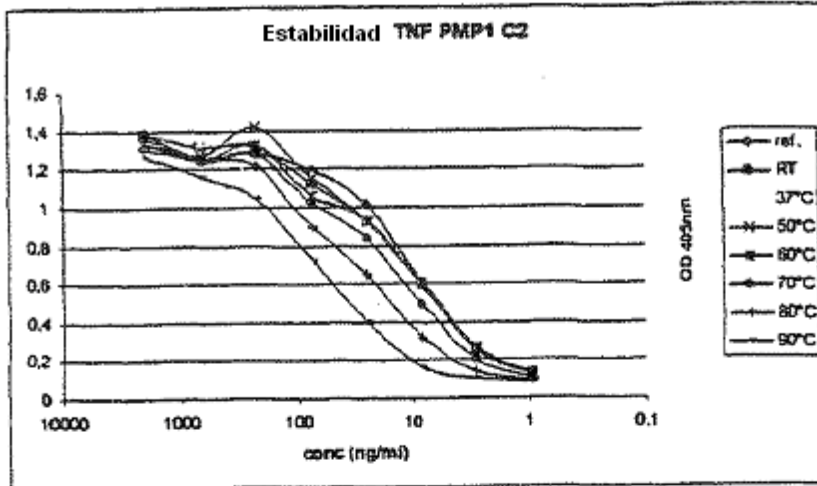


Figura 16

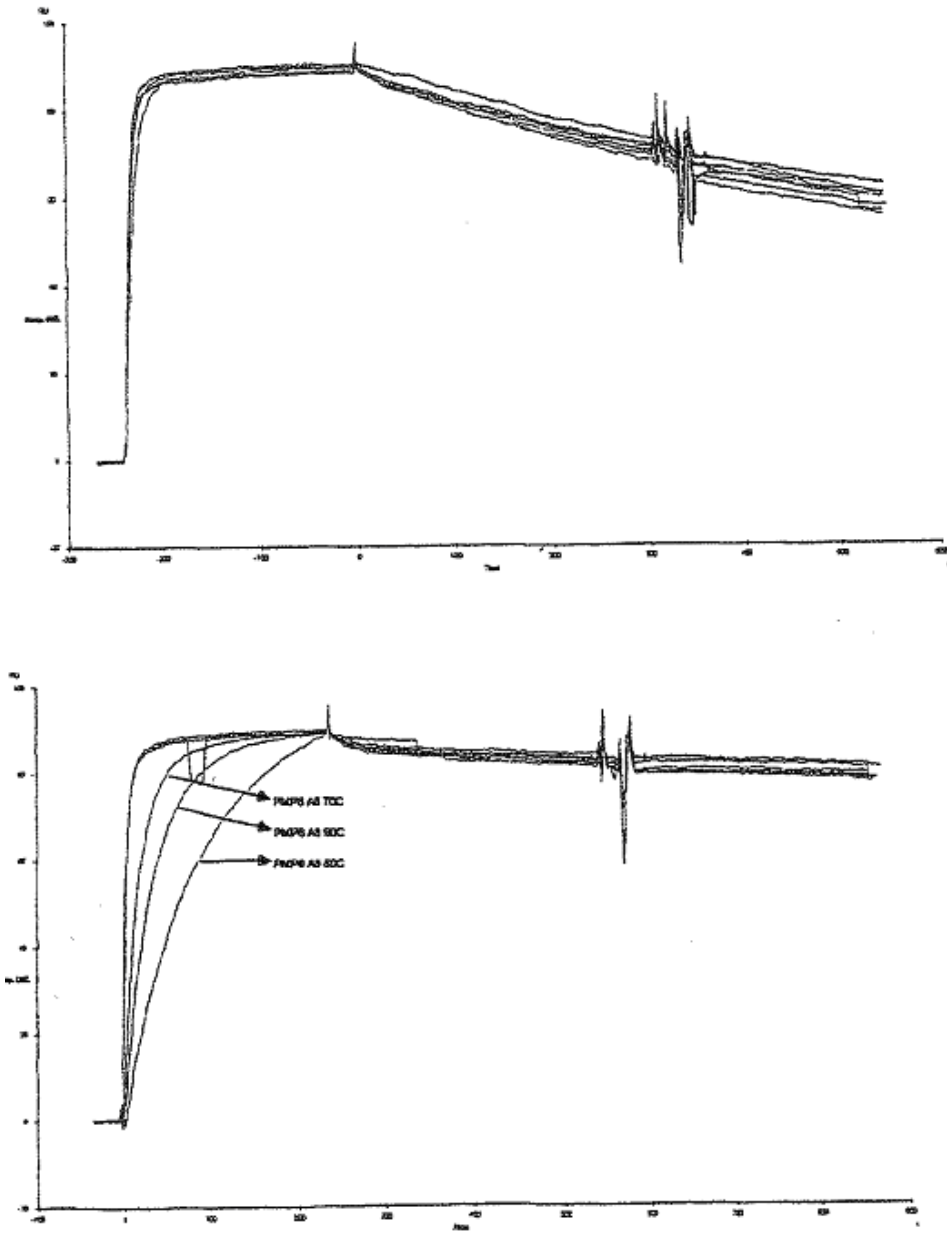


Figura 17

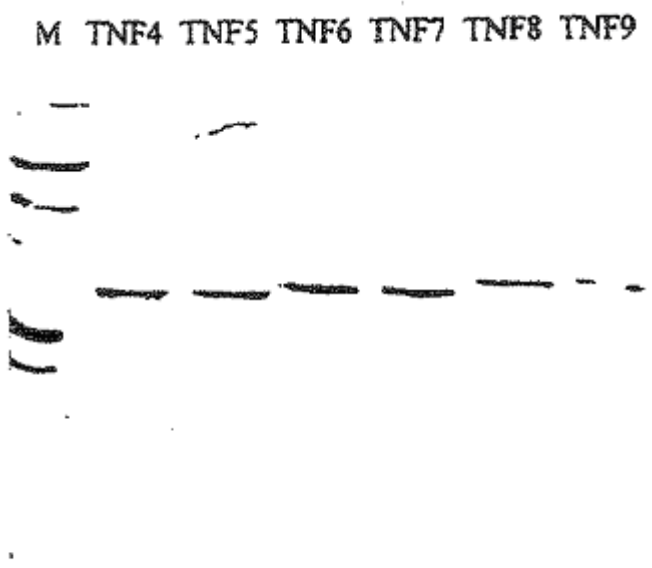
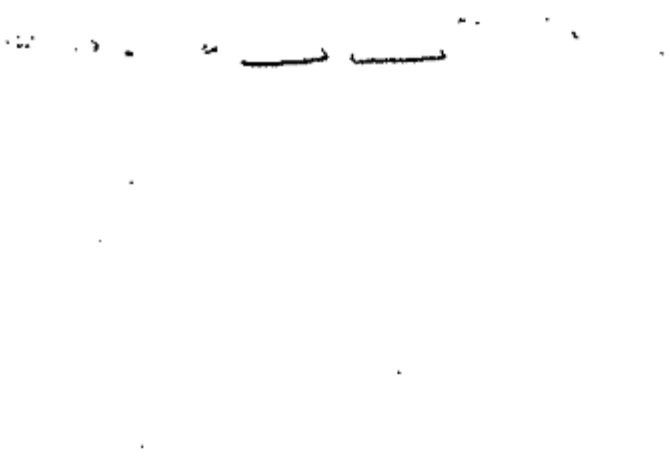


Figura 18

Anti-myc

TNF9 TNF8 TNF7 TNF6 TNF5 TNF4



A Western blot image showing six lanes labeled TNF9, TNF8, TNF7, TNF6, TNF5, and TNF4. The blot is probed with Anti-myc antibody. Bands of varying intensity are visible in each lane, with TNF8 and TNF7 showing the most prominent bands.

Anti-NB

TNF9 TNF8 TNF7 TNF6 TNF5 TNF4



A Western blot image showing six lanes labeled TNF9, TNF8, TNF7, TNF6, TNF5, and TNF4. The blot is probed with Anti-NB antibody. Bands of varying intensity are visible in each lane, with TNF8 and TNF7 showing the most prominent bands.

Figura 19

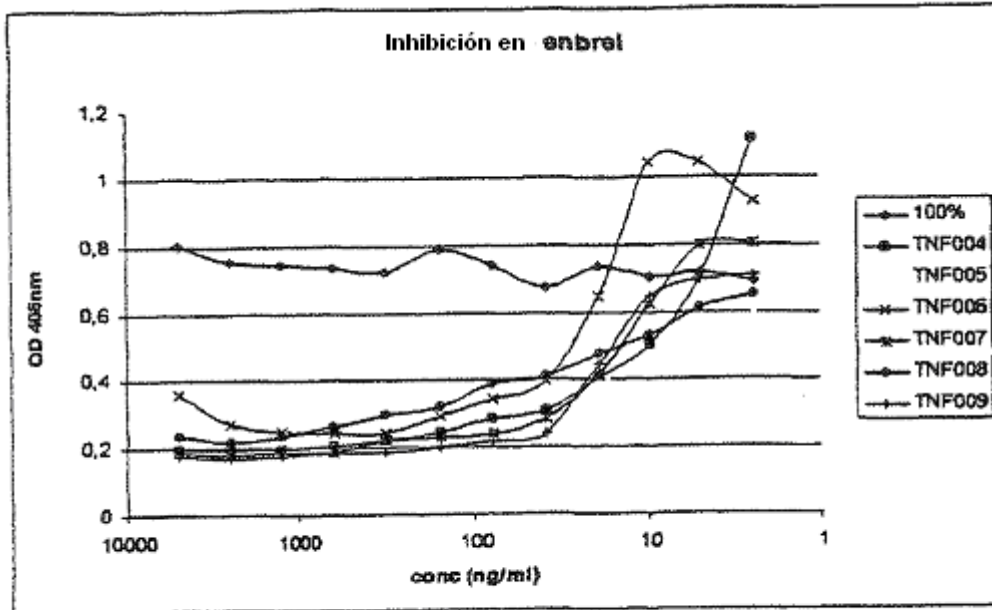


Figura 20

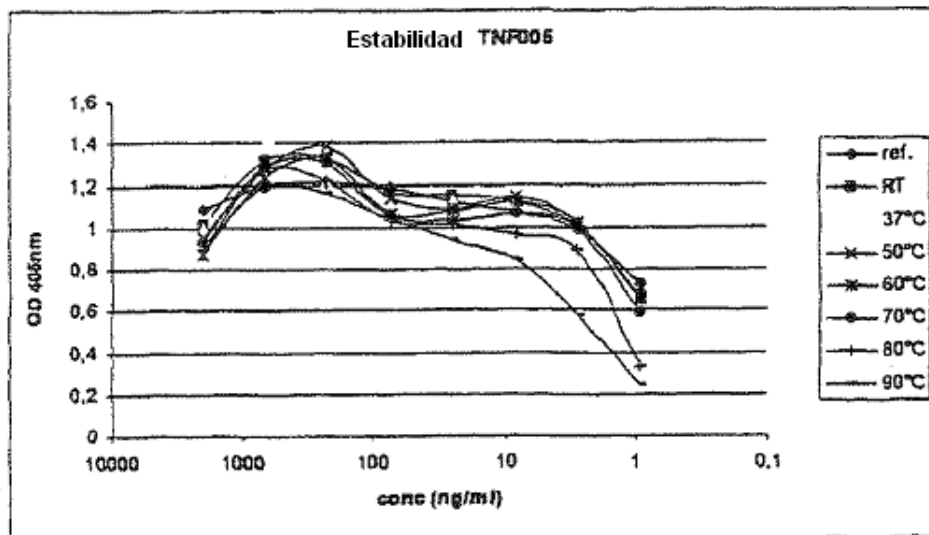
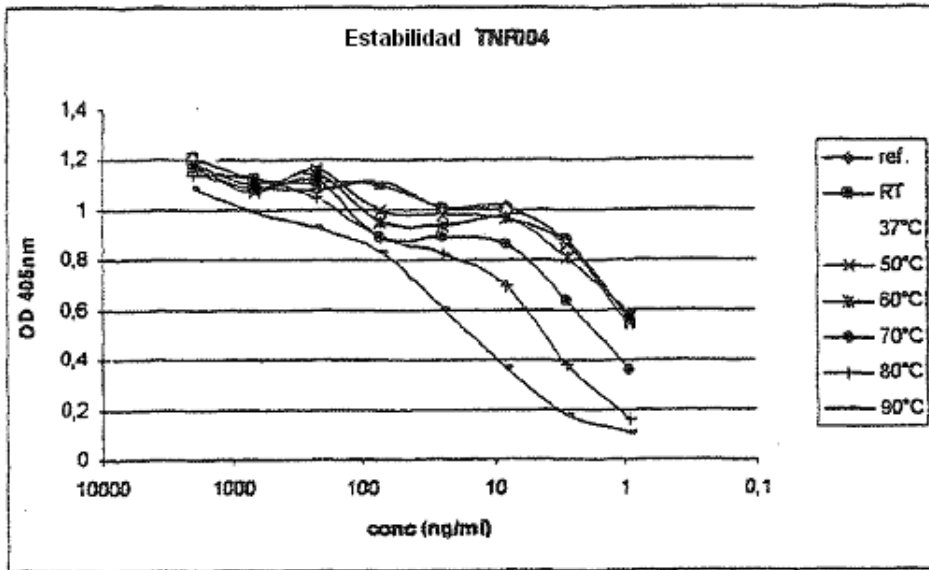


Figura 21

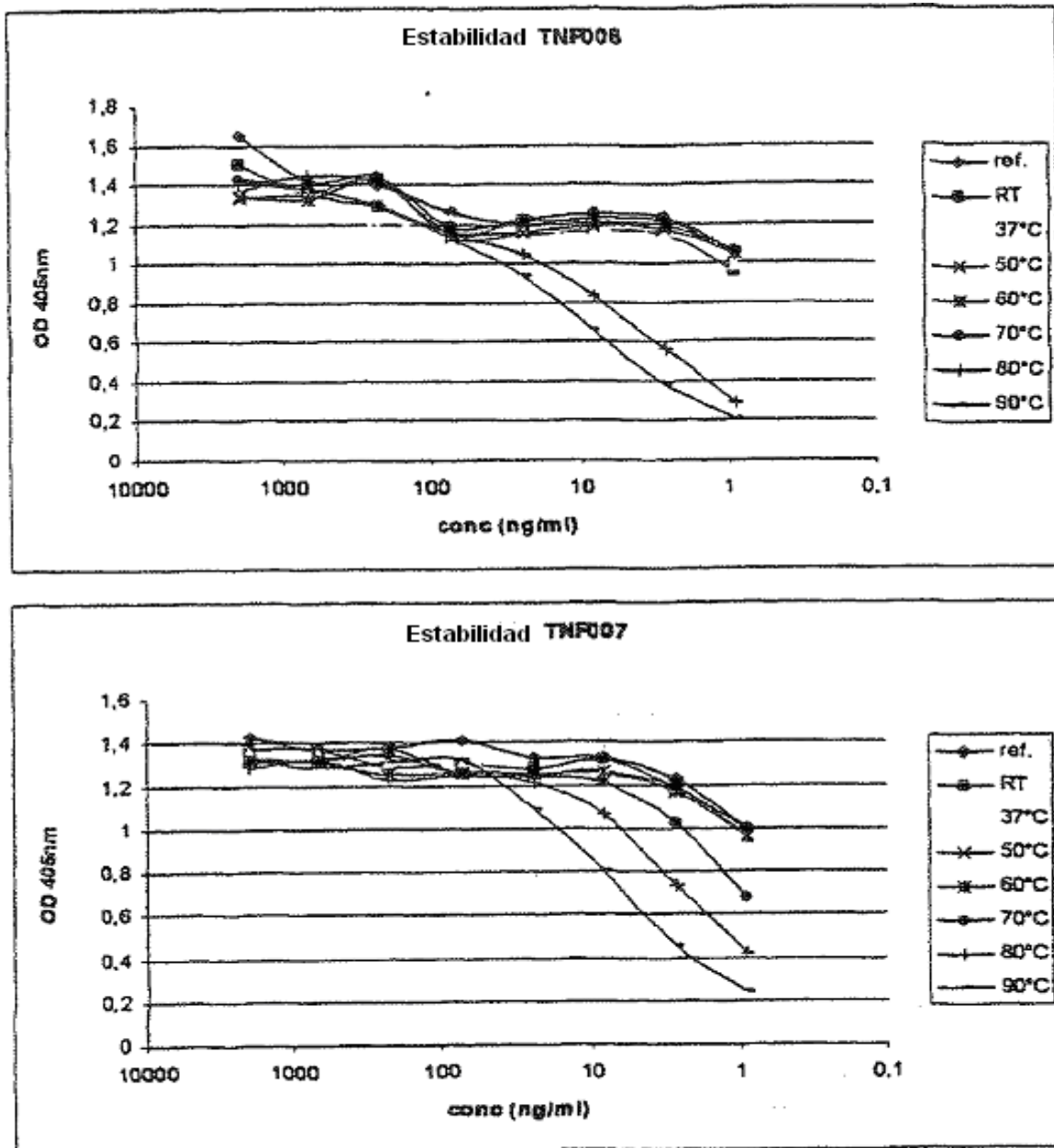


Figura 21

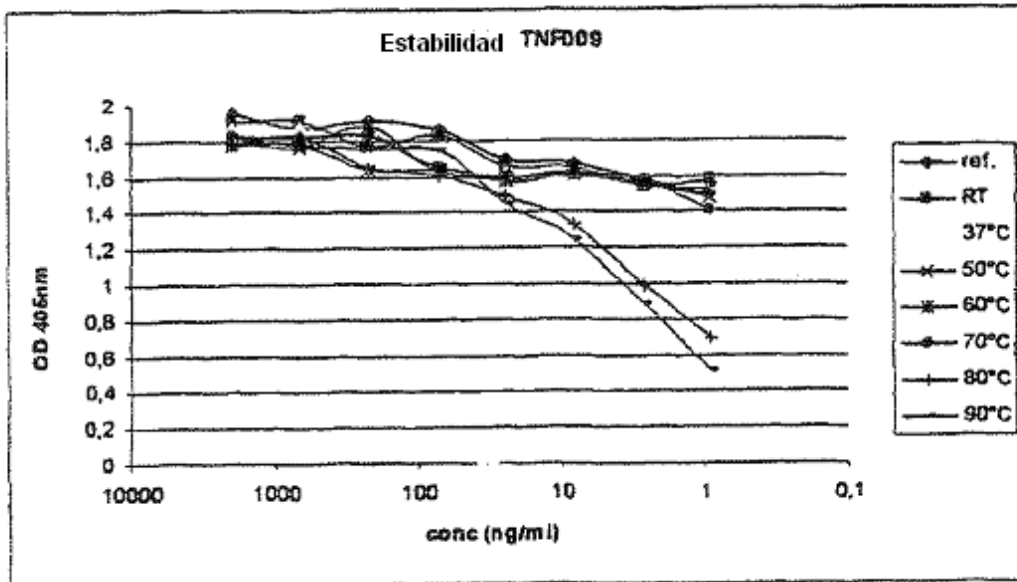
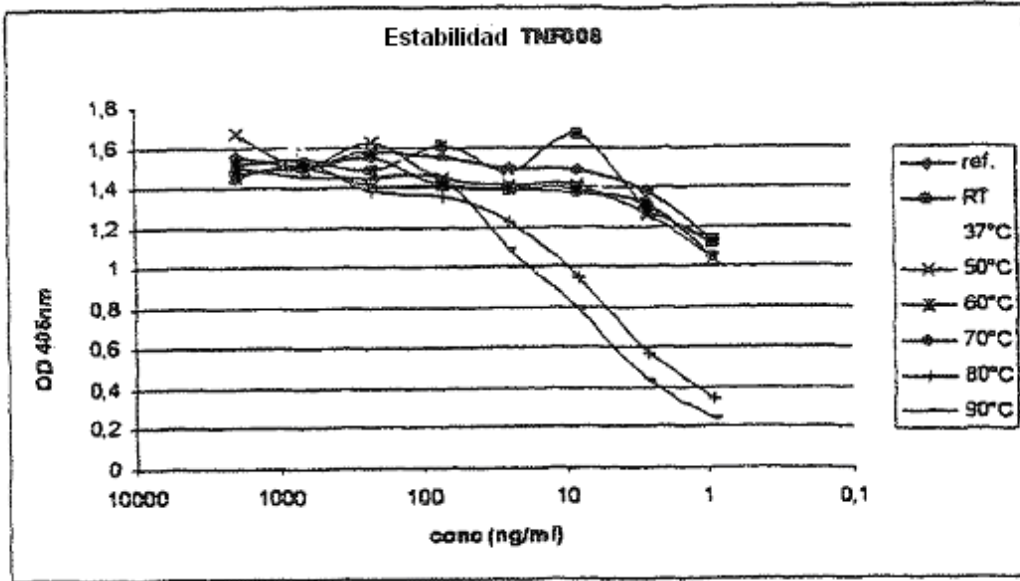


Figura 21-continuación

TNF1:
 EP51 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMN WVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYY (SEQ ID NO: 472)
 DP53 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMH WVRQAPGKGLVWVS RINSDGSSTYS (SEQ ID NO: 473)
 TNF1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 TNF13 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 TNF14 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 ***** * * ***** * * * * *

DP51 ADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR ----- WQGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 472 - continued)
 DP53 ADSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR ----- WQGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 473 - continued)
 TNF1 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTALYYCAR SPSPGFN RQGGTQVTVSS
 TNF13 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAR SPSPGFN RQGGTQVTVSS
 TNF14 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTALYYCAR SPSPGFN RQGGTLVTVSS
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Figura 22

TNF2:
 EP54 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -----SYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDSEKYY (SEQ ID NO: 474)
 TNF2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKEREVARIYWSGLTYY
 TNF15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSGLTYY
 TNF16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSGLTYY
 TNF17 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSGLTYY
 TNF18 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSGLTYY
 TNF19 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSGLTYY
 ***** ***** ***** * * ***** * * * * *

DP54 VDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR ----- WQGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 474 - continued)
 TNF2 ADSVKG RFTISRDIKNTVLDLQMNLSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVSGSYNY WQGGTQVTVSS
 TNF15 ADSVKG RFTISRDIKNTVLDLQMNLSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVSGSYNY WQGGTQVTVSS
 TNF16 ADSVKG RFTISRDIKNTVLDLQMNLSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVSGSYNY WQGGTQVTVSS
 TNF17 ADSVKG RFTISRDIKNTVLDLQMNLSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVSGSYNY WQGGTQVTVSS
 TNF18 ADSVKG RFTISRDIKNTVLDLQMNLSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVSGSYNY WQGGTQVTVSS
 TNF19 ADSVKG RFTISRDIKNTVLDLQMNLSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVSGSYNY WQGGTLVTVSS
 ***** ***** * * * * ***** ***** ***** *****

Figura 23

TNF3:
 DP29 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DHYMDWVRQAPGKGLEWVG RTRNKANSYTTEYAAS (SEQ ID NO: 475)
 TNF3 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSASGRSLS NYVMGWFRQAPGKERELG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLS NYVMGWFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF21 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYVMGWFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF22 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLS NYVMGWFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF23 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLS NYVMGWFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 ***** ***** * * * * ***** * * * * *

DP29 VKG RFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCAR----- WQGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 475 - continued)
 TNF3 VKG RFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WQGGTQVTVSS
 TNF20 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WQGGTQVTVSS
 TNF21 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WQGGTQVTVSS
 TNF22 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSLKTEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WQGGTQVTVSS
 TNF23 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WQGGTLVTVSS
 *** ***** * * ***** * * ***** ***** *****

Figura 24

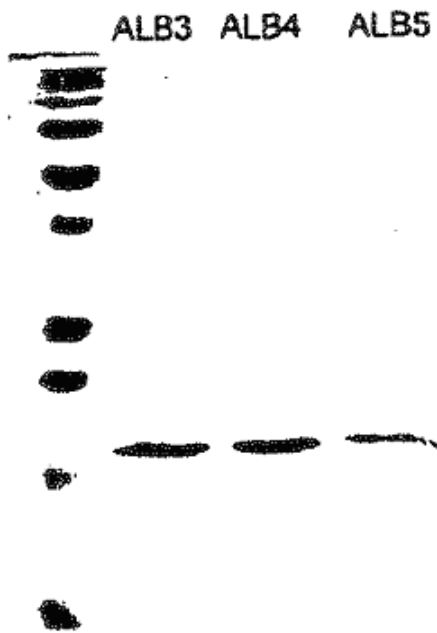
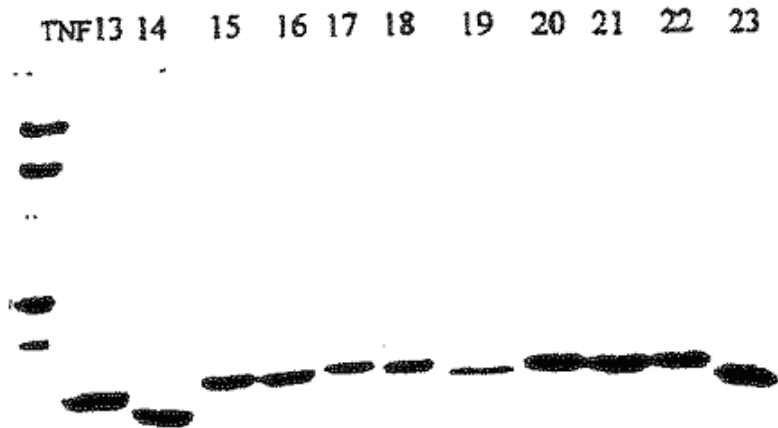


Figura 26

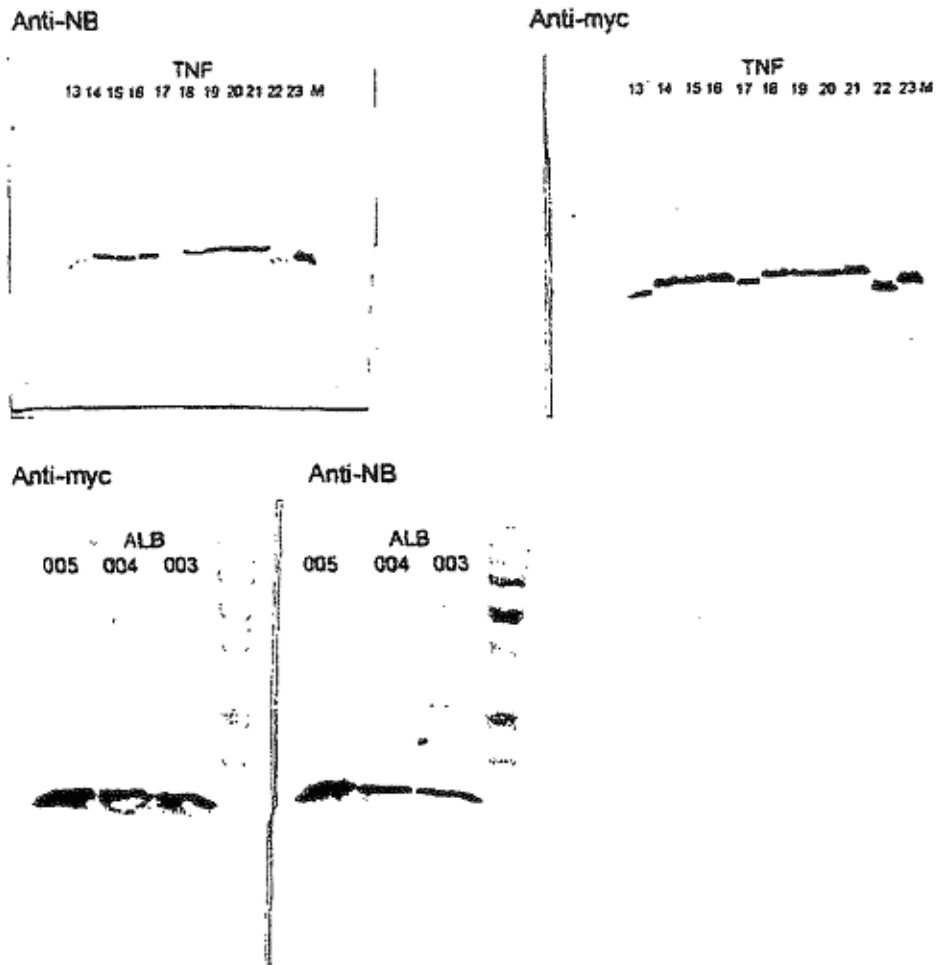
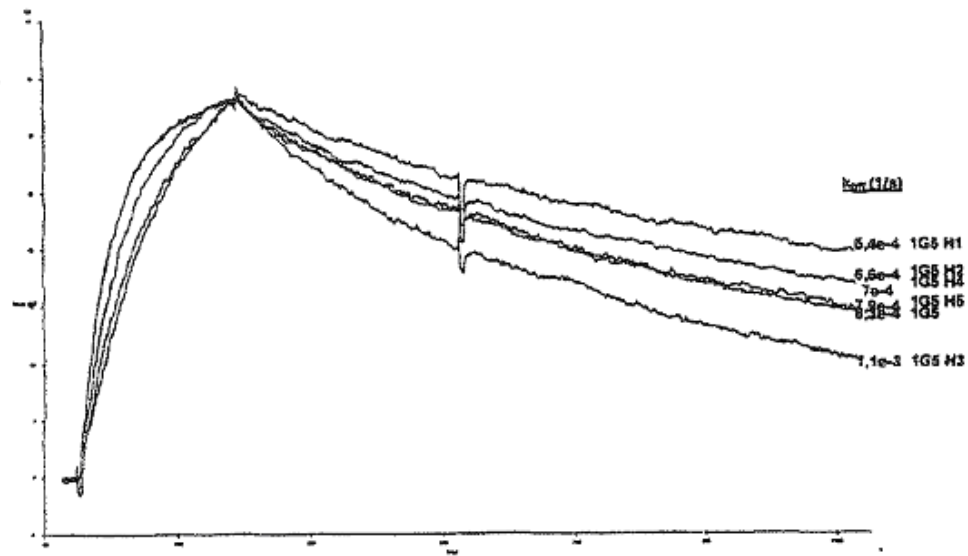
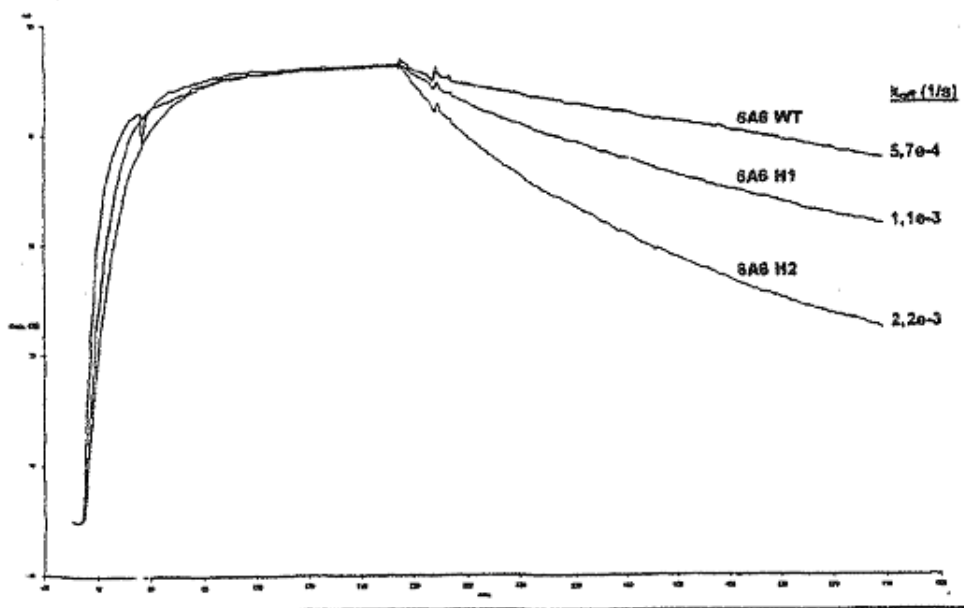


Figura 27

1G5WT y versiones humanizadas versus TNF humana (datos normalizados)



6A6 WT y versiones humanizadas versus TNF humana (datos normalizados)



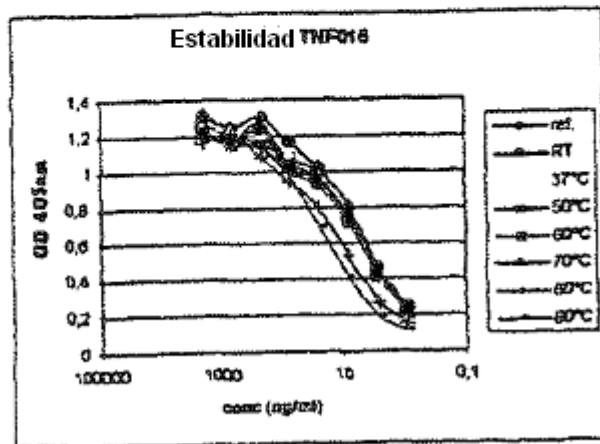
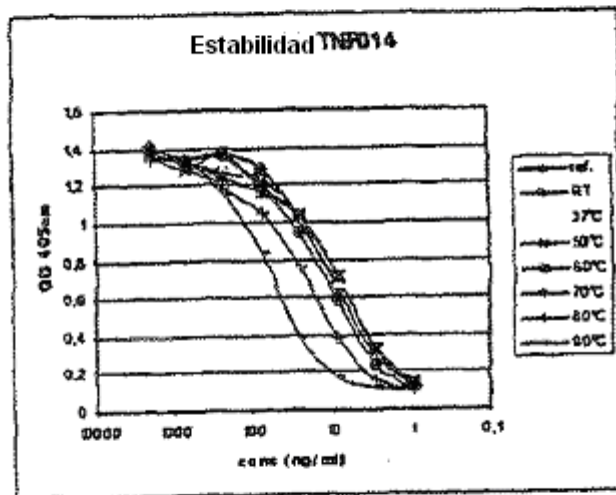
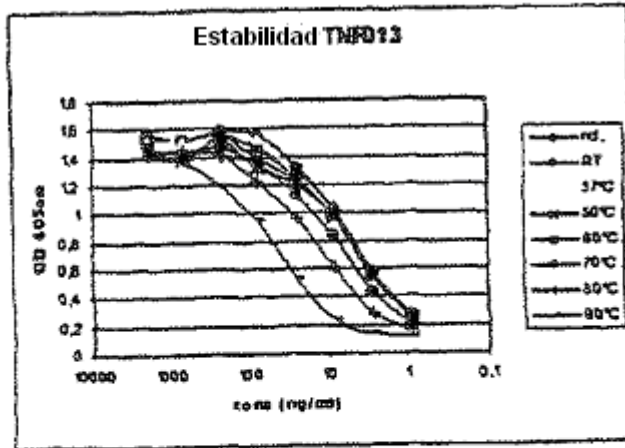


Figura 30

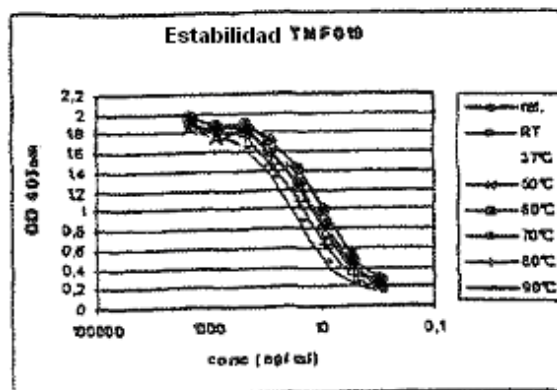
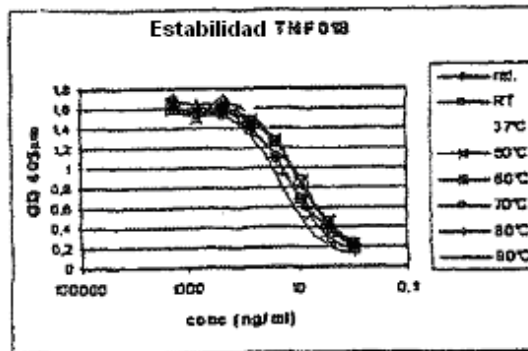
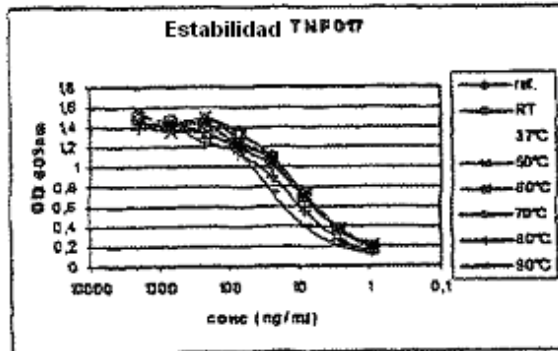
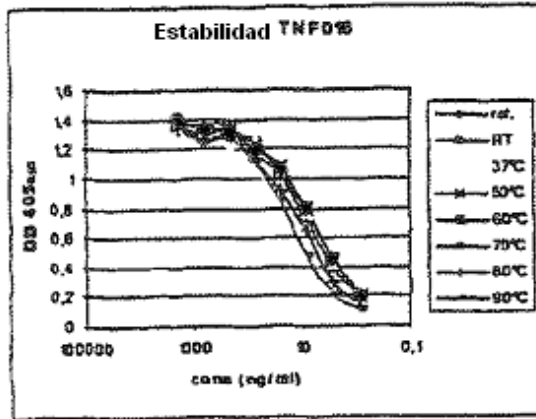


Figura 30 continuación

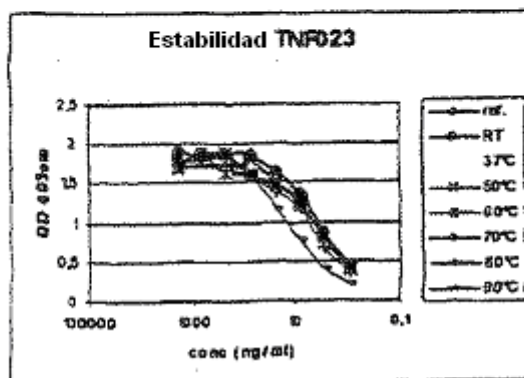
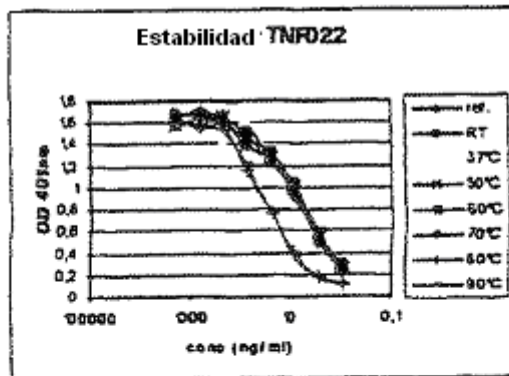
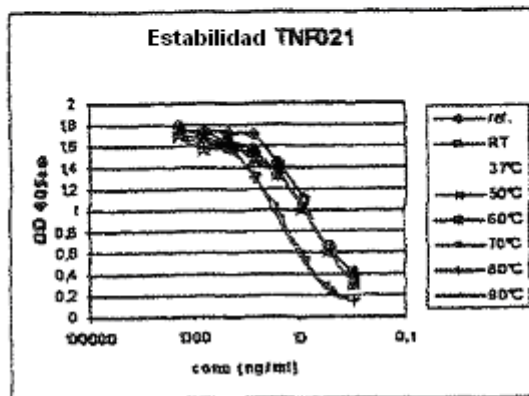
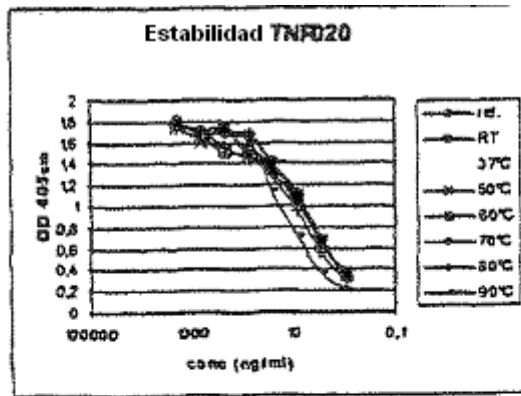


Figura 30 continuación

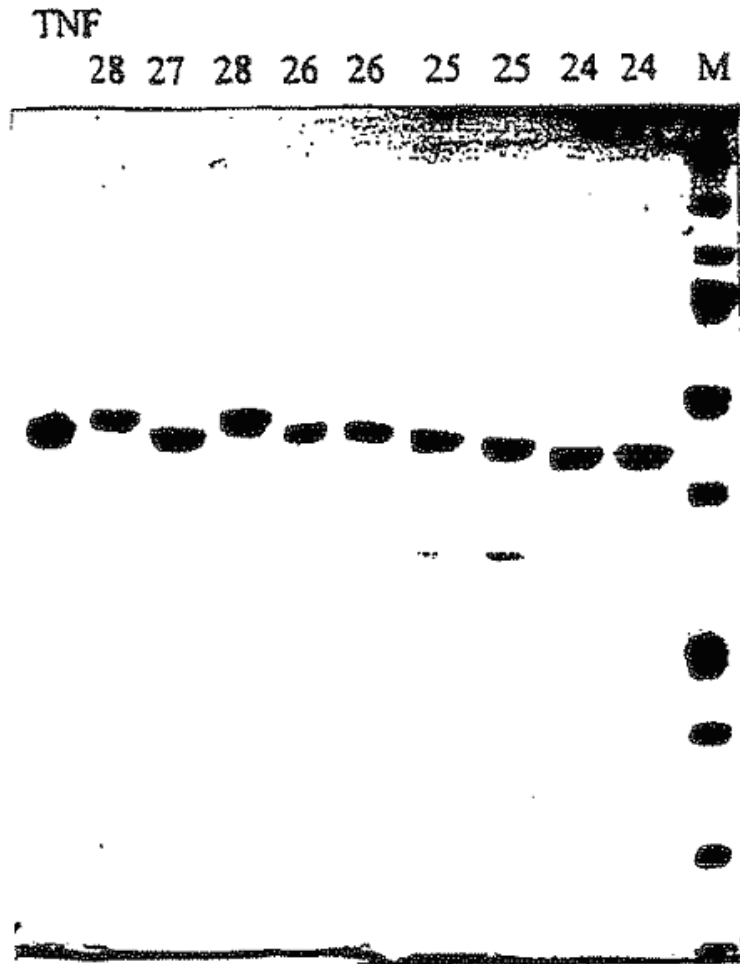


Figura 31

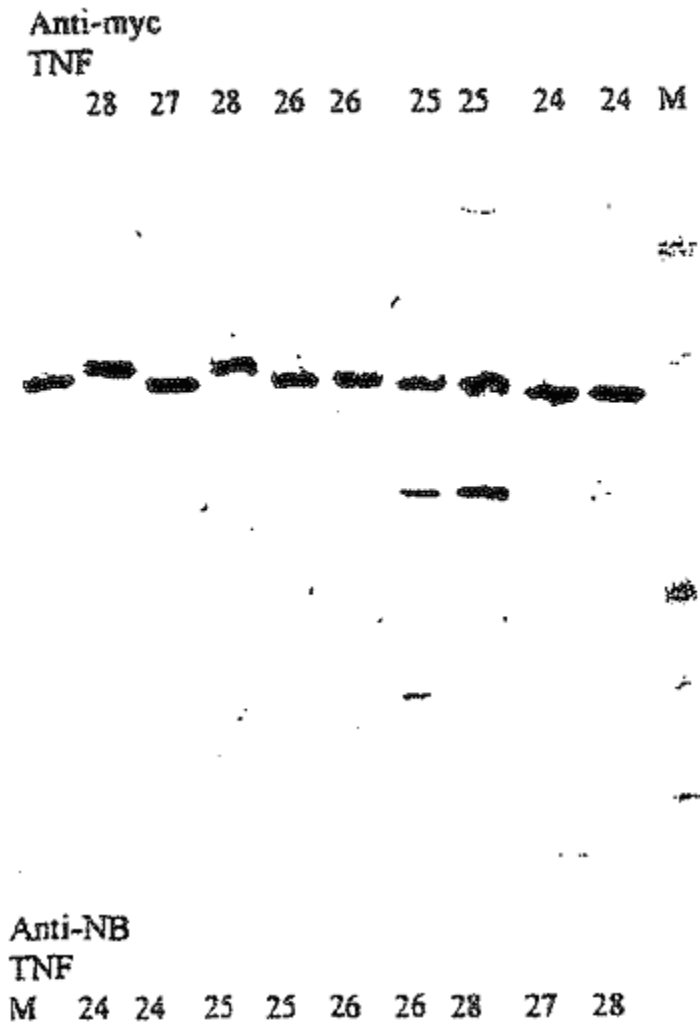


Figura 32

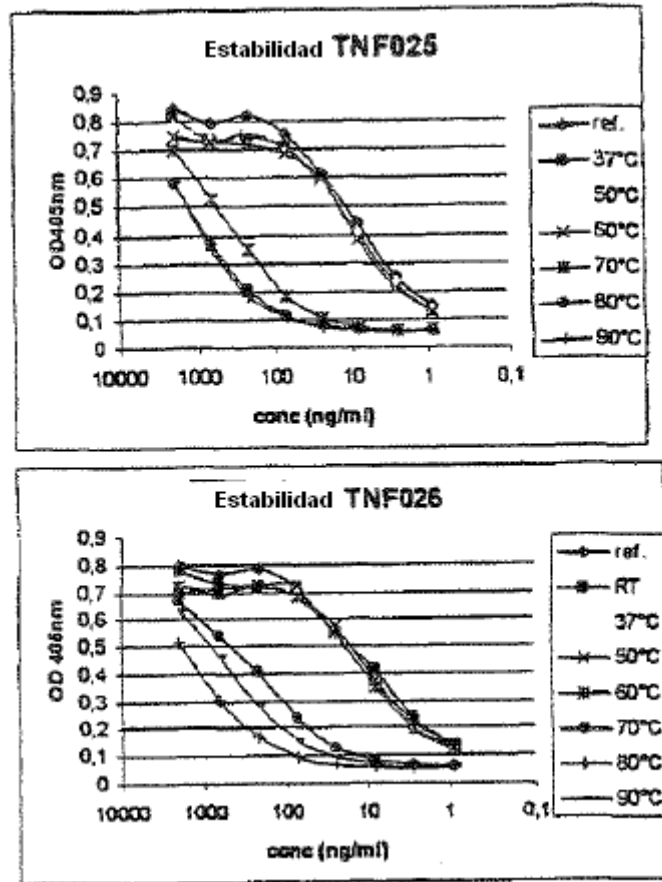


Figura 33

TNF1:
 DP51 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMN WVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYY
 OP53 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMH WVRQAPGKGLVWVS RINSDGSSTSY
 TNF1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 TNF13 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 TNF14 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 TNF29 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 TNF30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY
 e

DP51 ADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR ----- WGQGLTVTVSS
 DP53 ADSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ----- WGQGLTVTVSS
 TNF1 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAR SPSGFN RGQGTQVTVSS
 TNF13 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGTQVTVSS
 TNF14 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAR SPSGFN RGQGLTVTVSS
 TNF29 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGLTVTVSS
 TNF30 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGLTVTVSS
 ii b e

Figura 34

TNF2:
 DP54 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -----SYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKODGSEKYY
 TNF2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 TNF15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 TNF16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 TNF17 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 TNF18 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 TNF19 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 TNF31 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 TNF32 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY
 e i e b ei b

DP54 VDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ----- WGQGLTVTVSS
 TNF2 ADSVKG RFTISRDIKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGTQVTVSS
 TNF15 ADSVKG RFTISRDIKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGTQVTVSS
 TNF16 ADSVKG RFTISRDIKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGTQVTVSS
 TNF17 ADSVKG RFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGTQVTVSS
 TNF18 ADSVKG RFTISRDIKNTVDLQMNSLRPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGTQVTVSS
 TNF19 ADSVKG RFTISRDIKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGLTVTVSS
 TNF31 ADSVKG RFTISRDIKNTVDLQMNSLRPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGTQVTVSS
 TNF32 ADSVKG RFTISRDIKNTVDLQMNSLRPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVGSYNY WGQGLTVTVSS
 e bbb b ii b e

Figura 35

TNF3:
 DP29 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DHYMD WVRQAPGKGLEWVG RTRNKANSYTTTEYAAS
 TNF3 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASGRSLS NYVMG WFRQAPGKERELIG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF21 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF22 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF23 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 TNF33 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS
 i i i ebi b ei bb

OP29 VKG RFTISRDDSKNLSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR ----- WGQGTLLVTVSS
 TNF3 VKG RFTISRDDAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS
 TNF20 VKG RFTISRDDSKNNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS
 TNF21 VKG RFTISRDDSKNNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS
 TNF22 VKG RFTISRDDSKNNTIYLQMNSLKTEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS
 TNF23 VKG RFTISRDDSKNNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTLLVTVSS
 TNF33 VKG RFTISRDDSKNNTIYLQMNSLRPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTLLVTVSS
 e bb i ii b e

Figura 36

ALB1:
 DP51 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMN WVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYYADSVKG
 DP53 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMK WVRQAPGKGLVWVS RINSDGSSTSYADSVKG
 ALB1 AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFR SFGMS WVRQAPGKEPEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR SFGMS WVRQAPGKEPEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SFGMS WVRQAPGKEPEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB6 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFR SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB7 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFR SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB8 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB9 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 ALB10 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG
 e i i ei

DP51 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDIEDTAVYYCAR ----- WGQGTLLVTVSS
 DP53 RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ----- WGQGTLLVTVSS
 ALB1 RFTISRDNAKTTLTYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS
 ALB3 RFTISRDNAKTTLTYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS
 ALB4 RFTISRDNAKTTLTYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS
 ALB5 RFTISRDNAKTTLTYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS
 ALB6 RFTISRDNAKTTLTYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTLLVTVSS
 ALB7 RFTISRDNAKTTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTLLVTVSS
 ALB8 RFTISRDNAKTTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTLLVTVSS
 ALB9 RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTLLVTVSS
 ALB10 RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTLLVTVSS
 i ii bb ib i

Figura 37

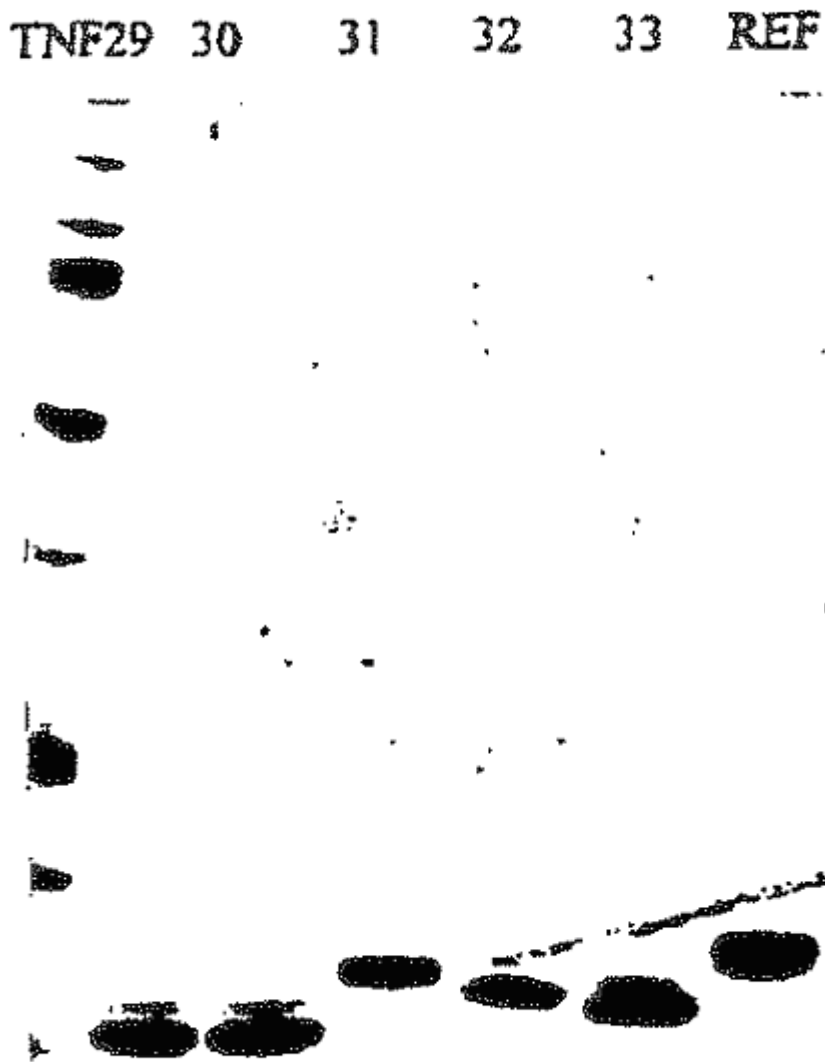


Figura 38

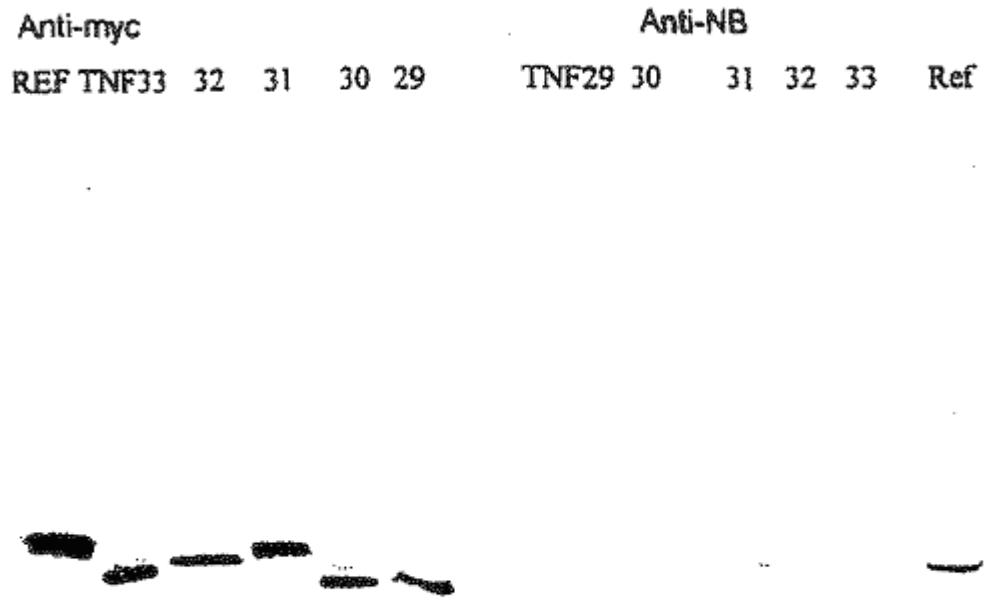
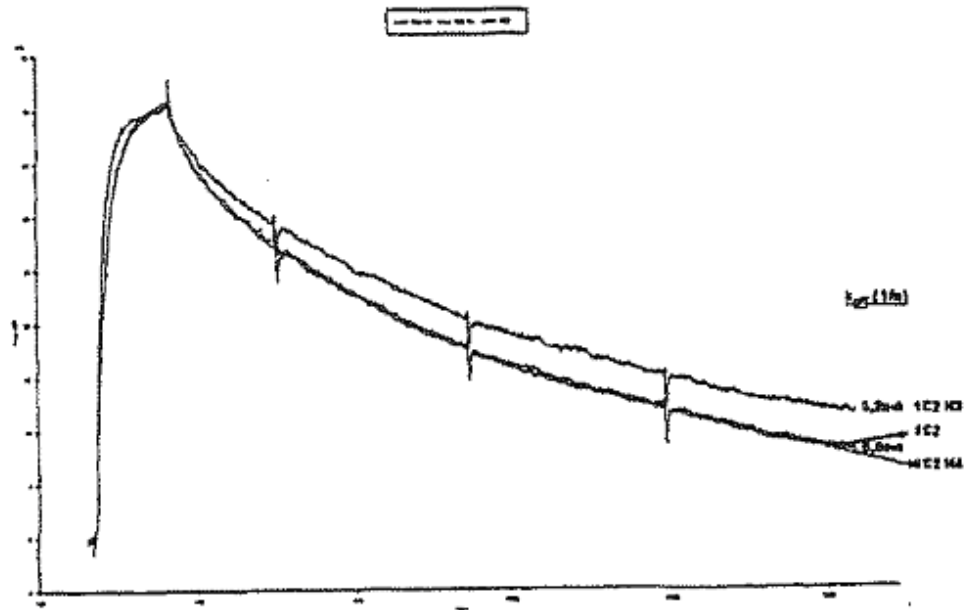


Figura 39

1C2WT y versiones humanizadas versus TNF humana (datos normalizados)



1G5WT y versiones humanizadas versus TNF humana (datos normalizados)

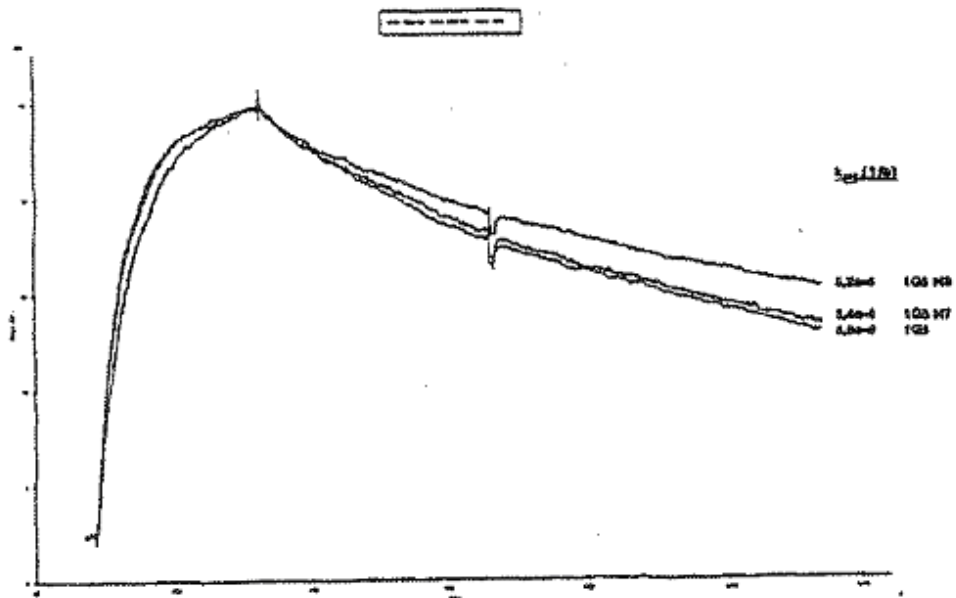


Figura 40

5F10WT y versiones humanizadas versus TNF humana (datos normalizados)

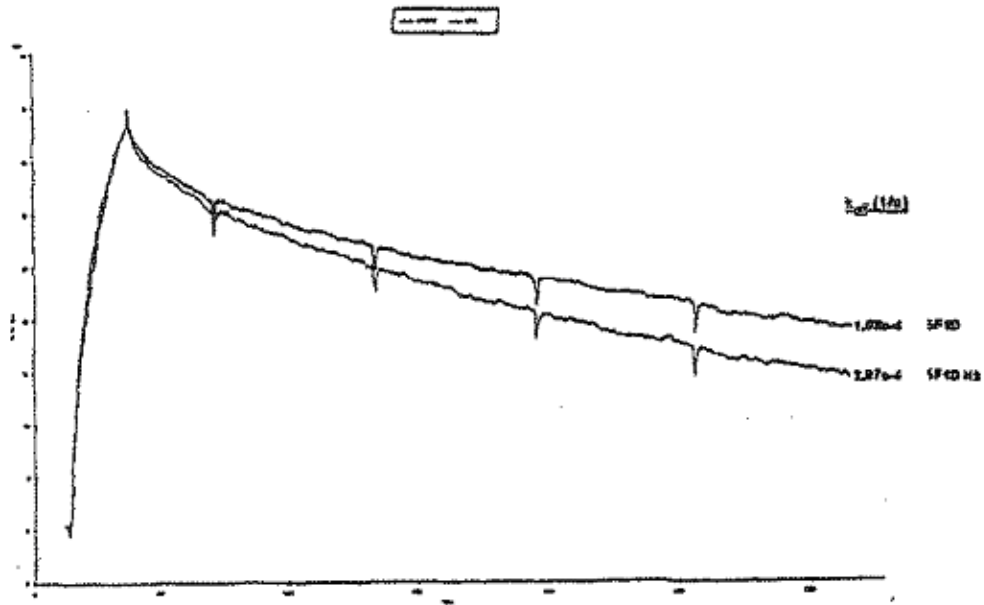


Figura 40 (continuación)

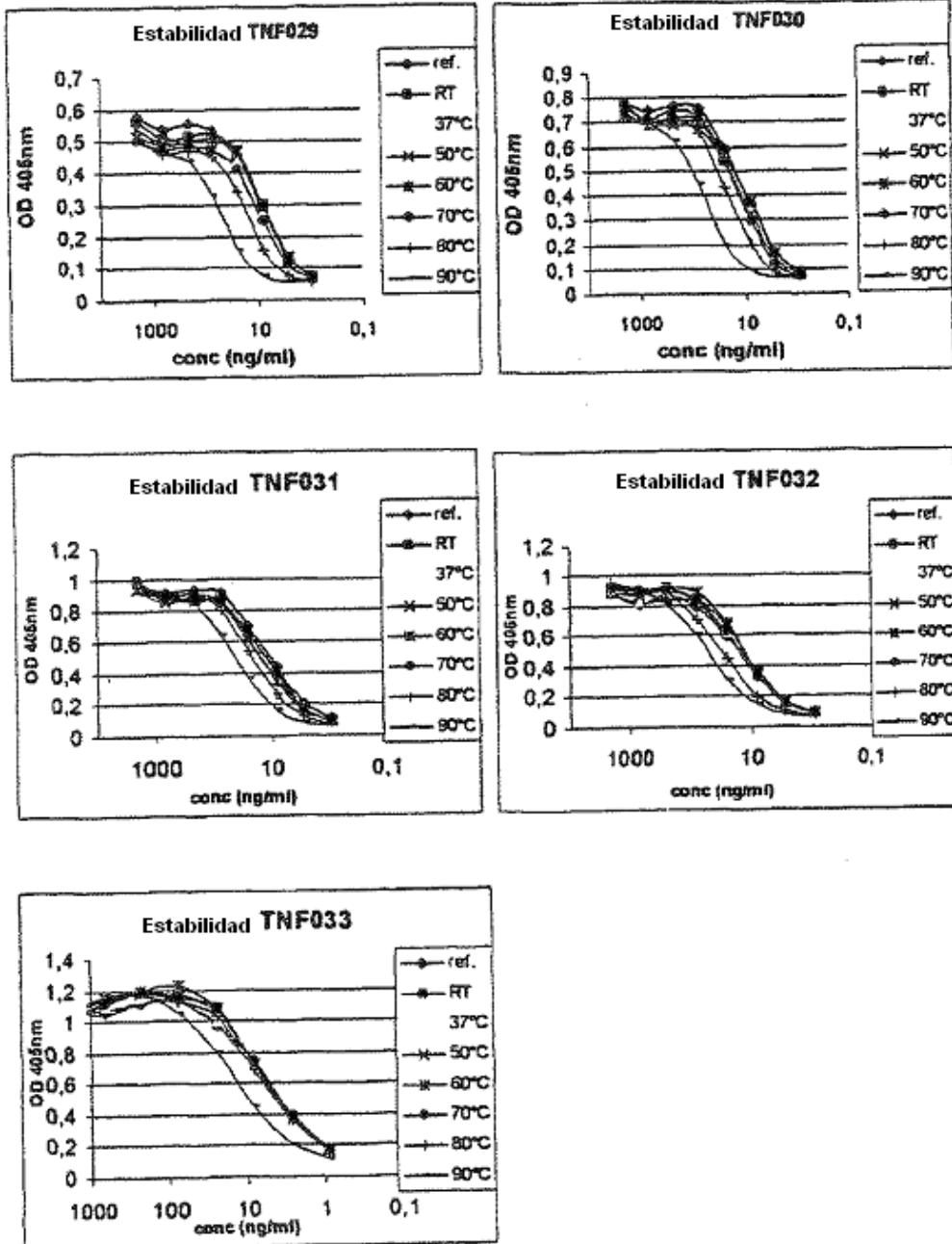


Figura 41

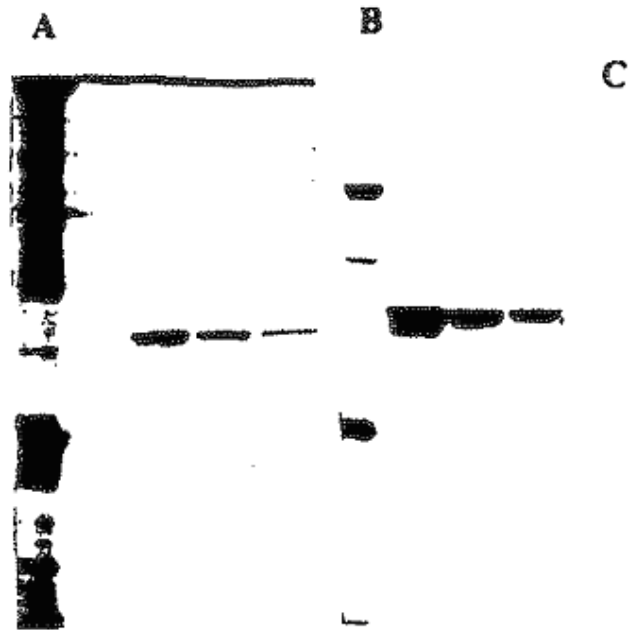


Figura 42

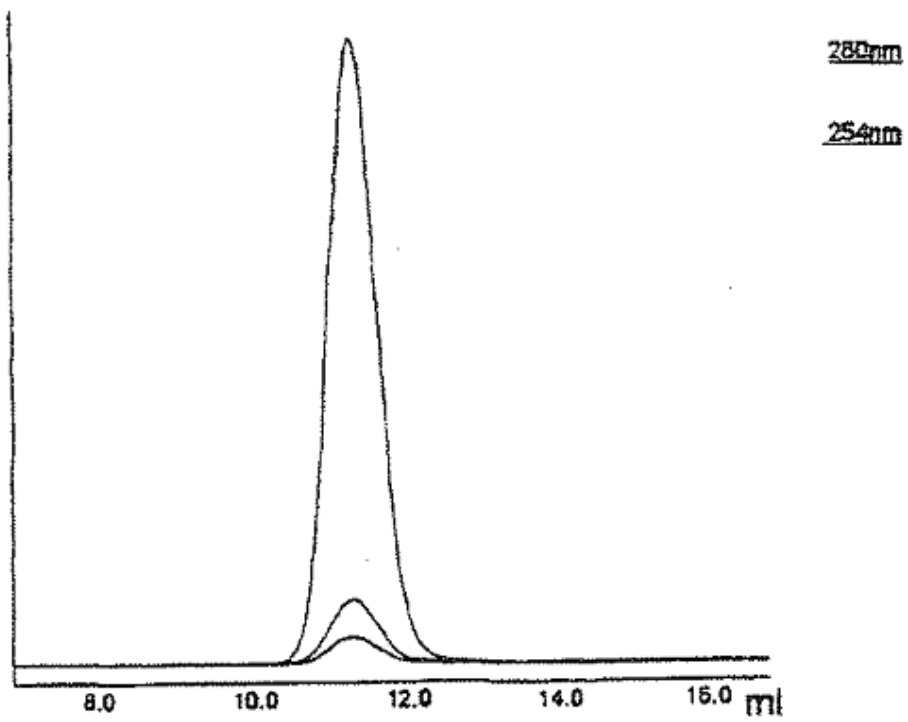


Figura 43

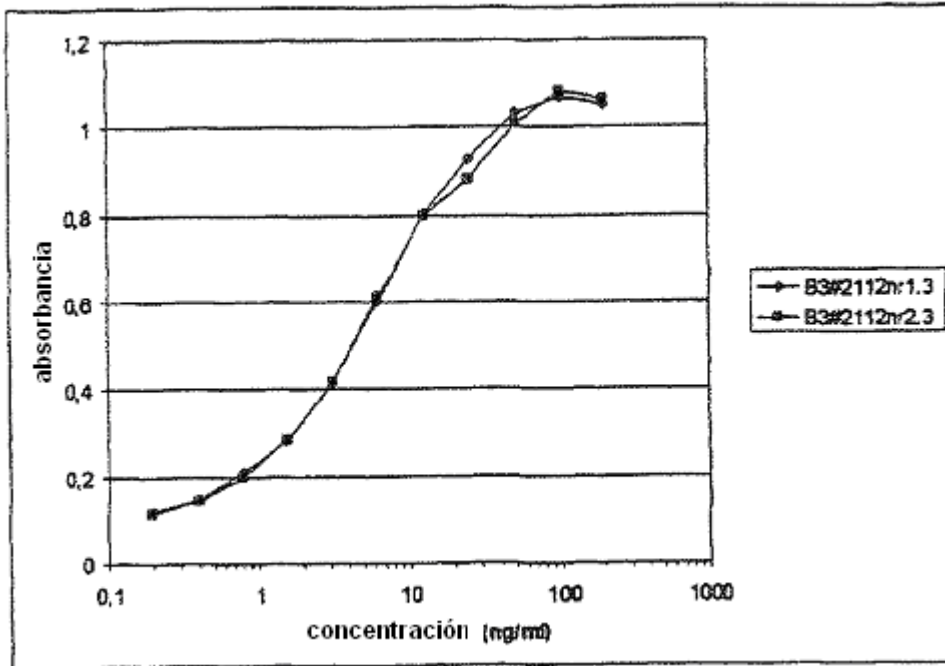


Figura 44

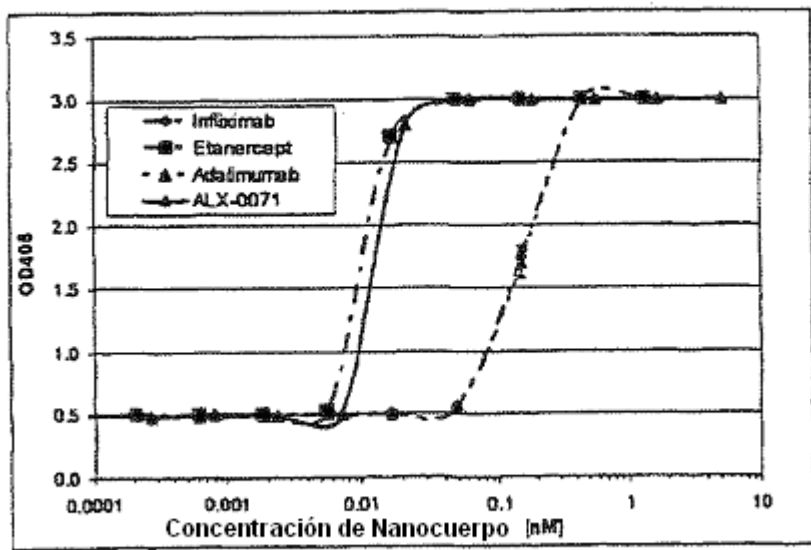


Figura 45

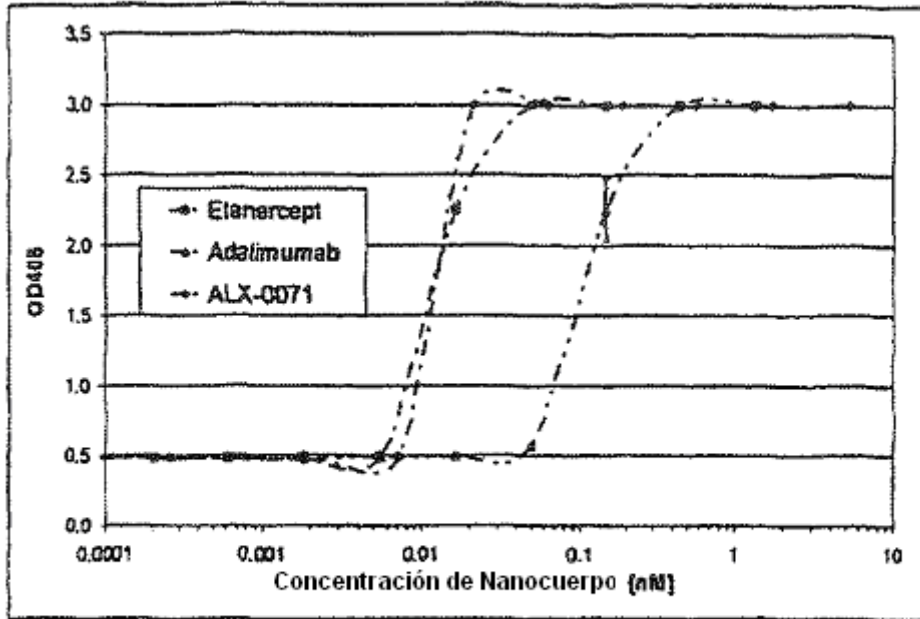


Figura 46

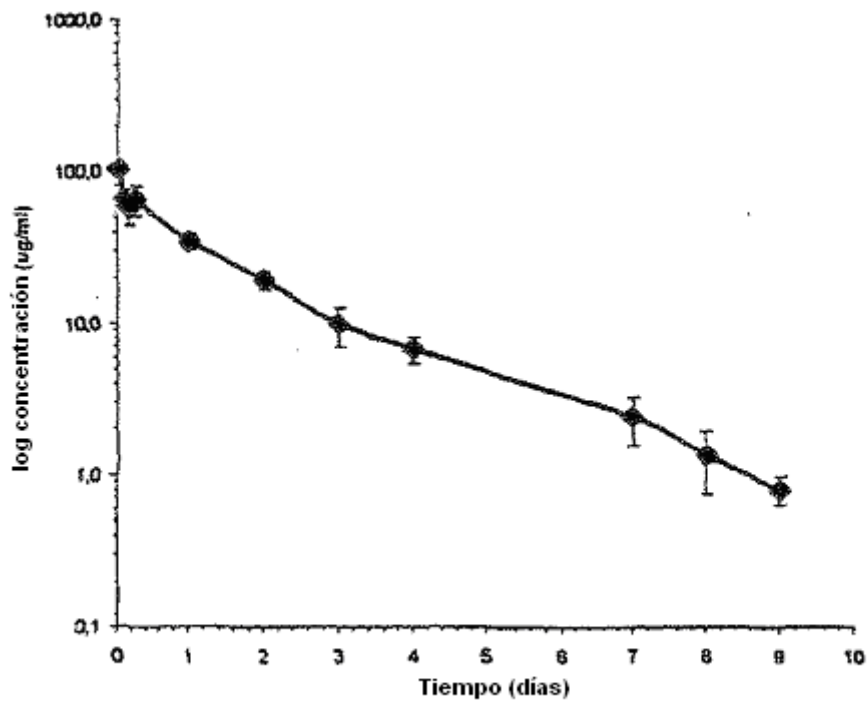


Figura 47

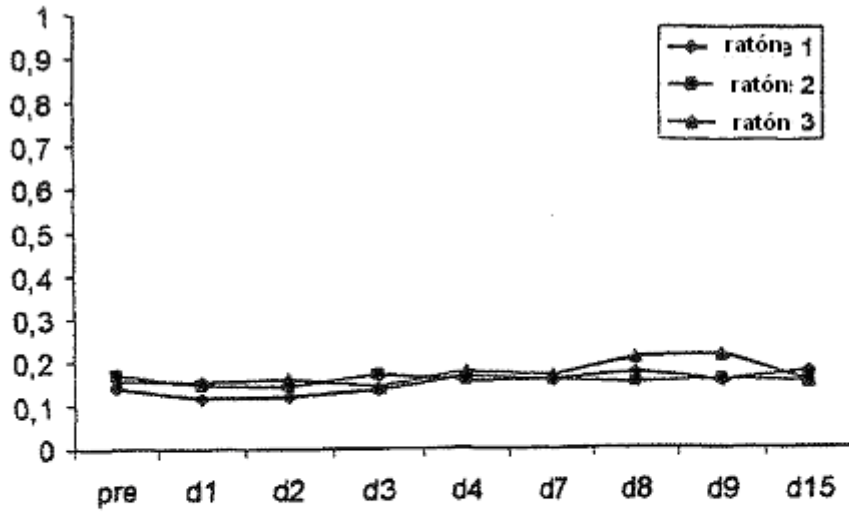


Figura 48

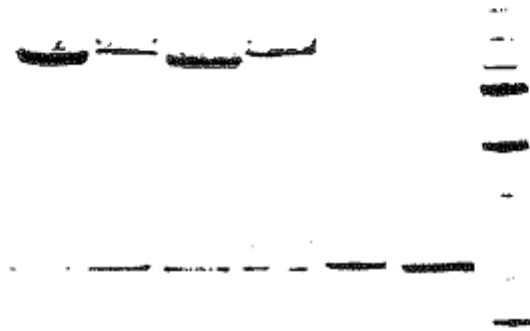


Figura 49

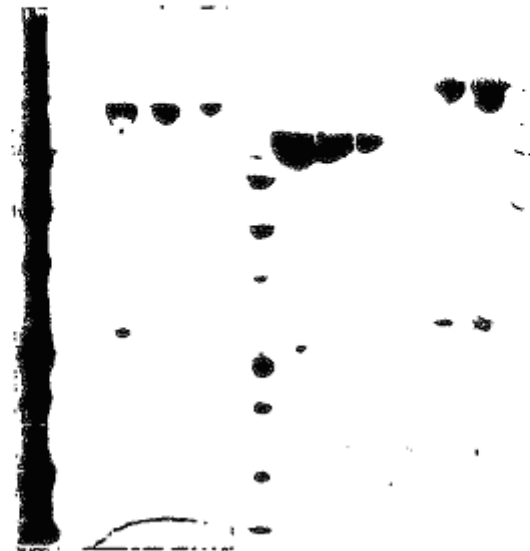
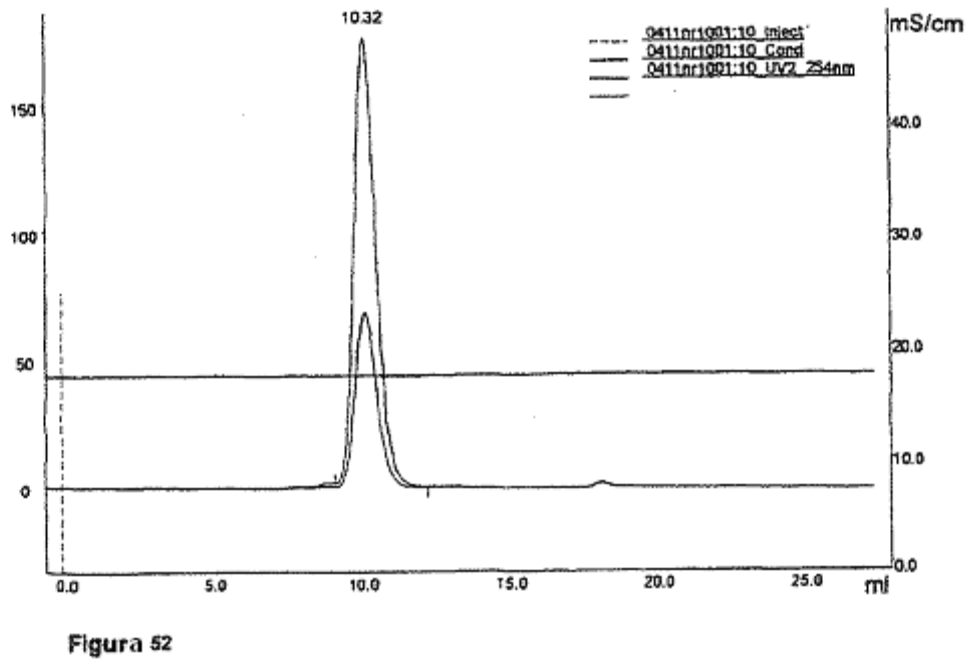
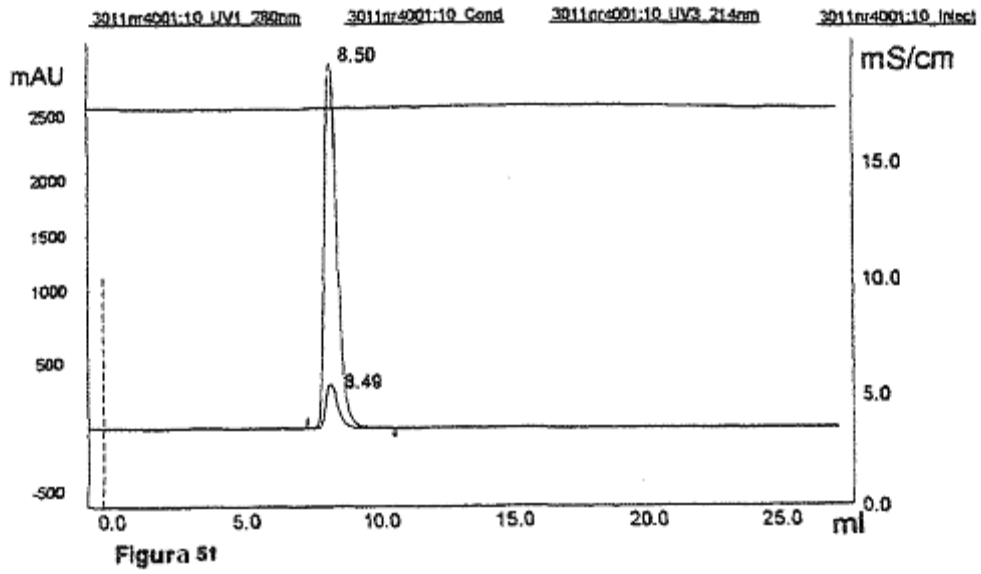


Figura 50



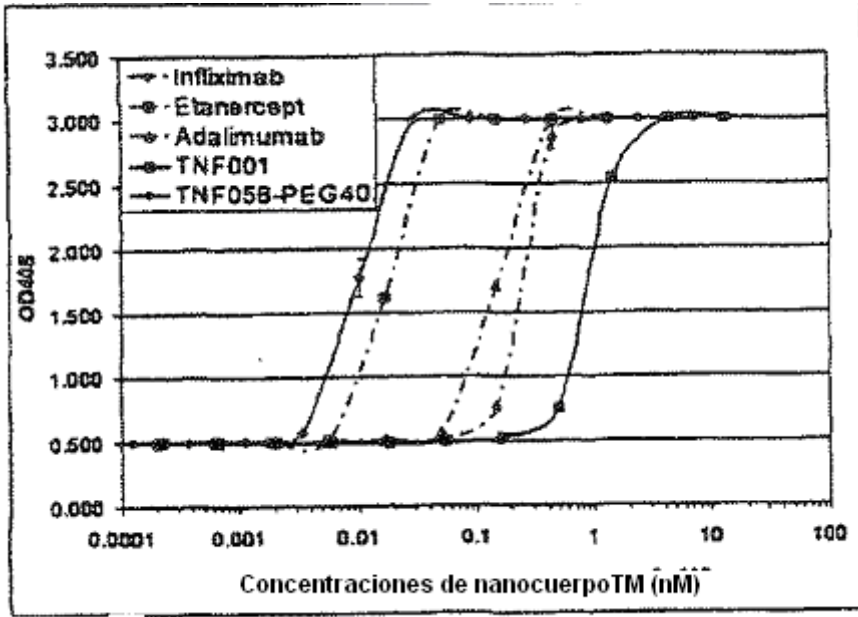
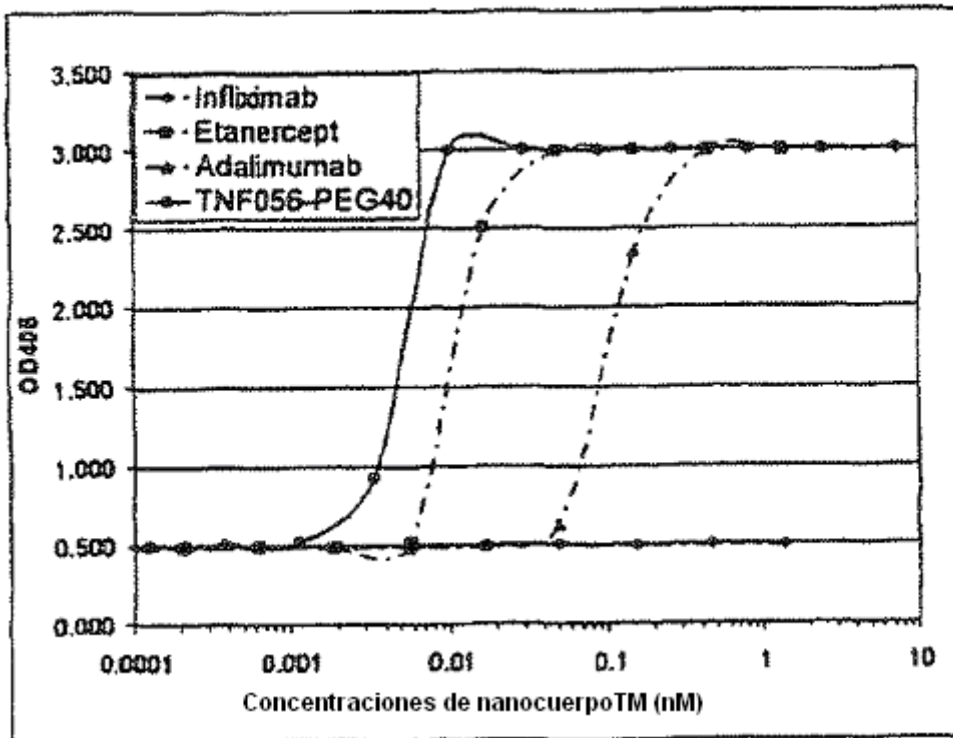


Figura 53



al

Figura 54

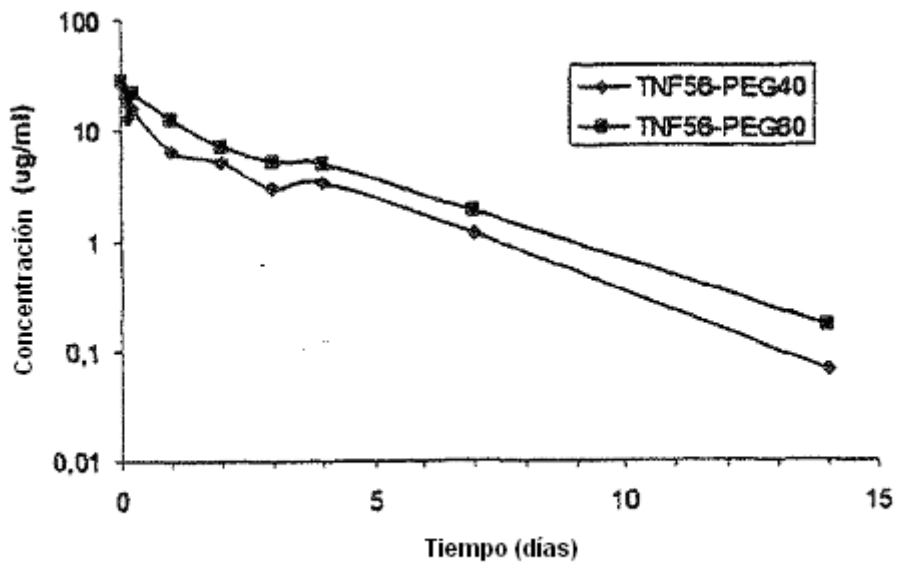


Figura 55

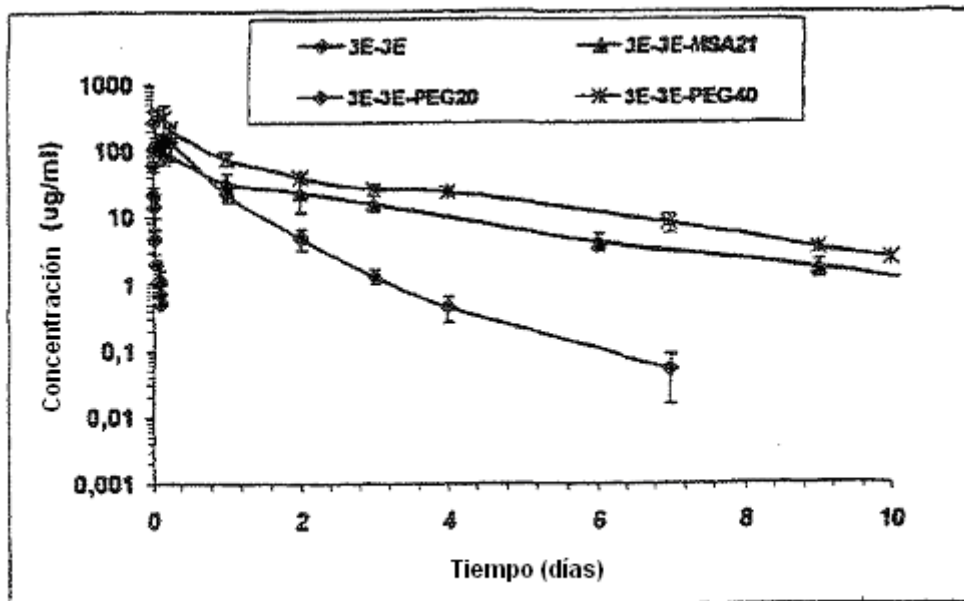


Figura 56

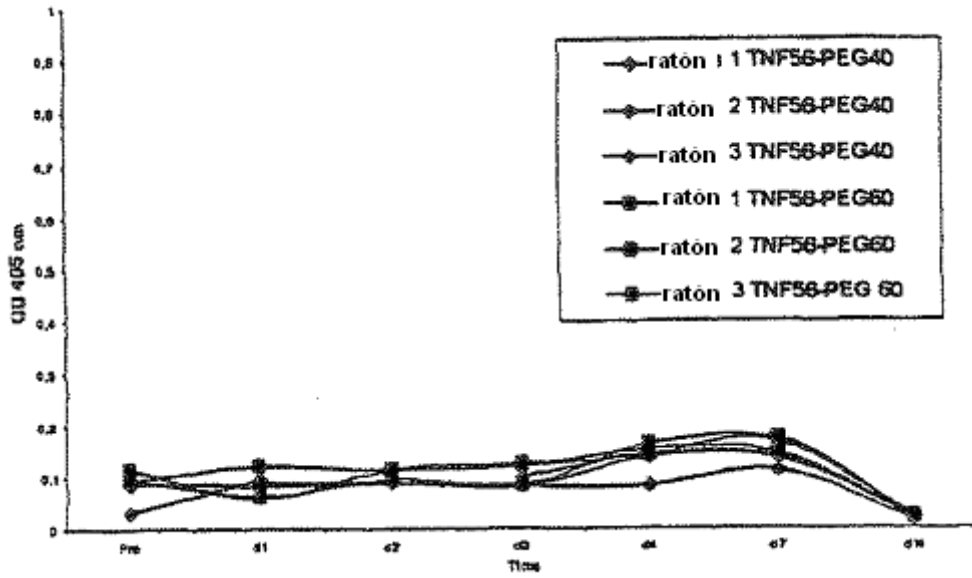


Figura 57

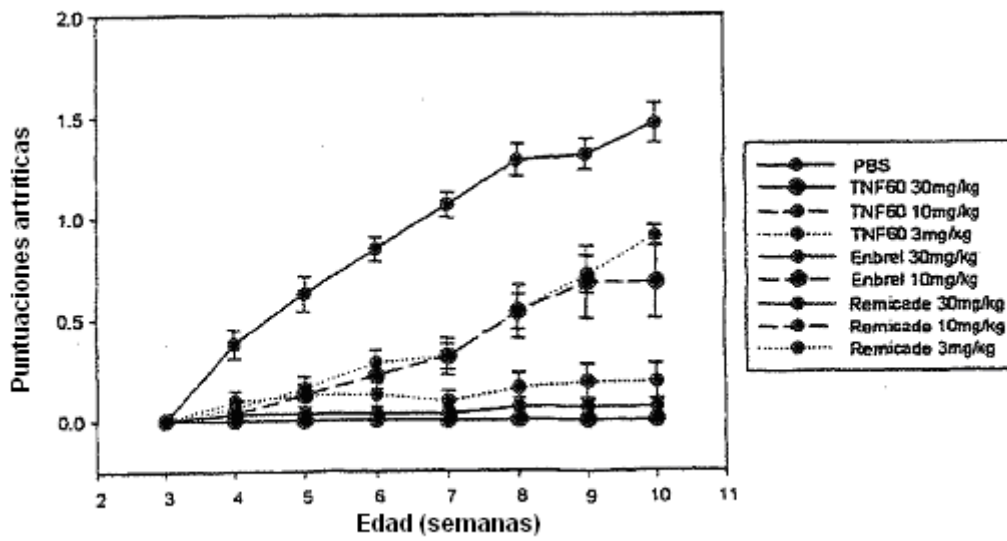


Figura 58

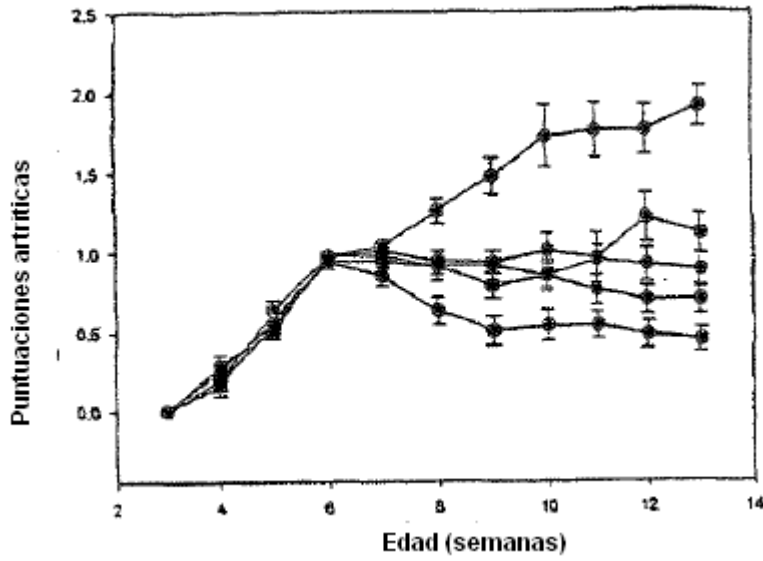
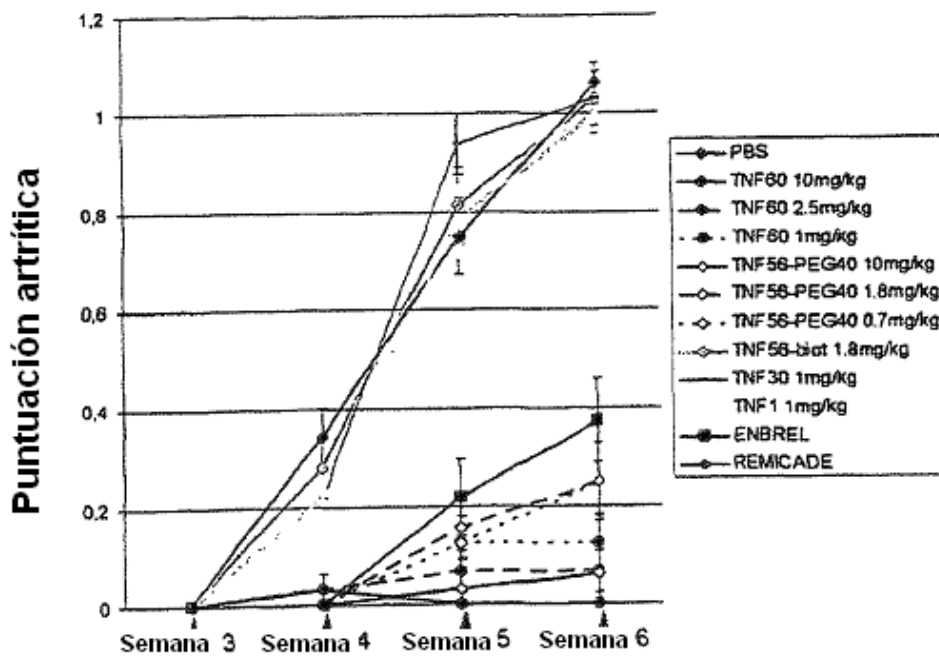


Figura 59



ES 2 384 164 T3

		1		50
PMP1C2+M13rev	(1)	QVQLVHEGQGLVQPGGSLRLS	CAASGRTFSDYW-----MYWVRQAPGKGL	
VHH1A	(1)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAATSGFDPSVSW-----MYWVRQAPGKGL	
VHH3E	(1)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKER	
VHH3G	(1)	QVQLQDSGGGLVQAPGSLRLS	CAVSGRTFSAHS--VYTMGWFRQAPGKER	
Consensus	(1)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTFSDHW YTMWVRQAPGKER	
		51		100
PMP1C2+M13rev	(46)	EWVSEINTNGLITKYVDSVKGR	FTISRDNAKNTLYLQMN	SLKPEDTALVY
VHH1A	(46)	EWVSEINTNGLITKYVDSVKGR	FTISRDNAKNTLYLQMD	SLIPEDTALVY
VHH3E	(51)	EFVARIYWSSGNTYVADSVKGR	FATSRDTAKNTVDLTMN	LEPEDTALVY
VHH3G	(49)	EFVARIYWSSANTYVADSVKGR	FTISRDNAKNTVDLLMN	SLKPEDTAVY
Consensus	(51)	EFVARIYWSSLNTYVADSVKGR	FTISRDNAKNTLYLQMN	SLKPEDTALVY
		101		129
PMP1C2+M13rev	(96)	CAE-----EP--SGE-NRGQGTQ	VTVSS	
VHH1A	(96)	CAE-----EP--SGS-ERGQGTQ	VTVSS	
VHH3E	(101)	CAARDGIPTSRSVSSYNYWGQGTQ	VTVSS	
VHH3G	(99)	CAARDGIPTSRTVSSYNYWGQGTQ	VTVSS	
Consensus	(101)	CARRDGIPTSRSVSSYNYWGQGTQ	VTVSS	

Figura 61

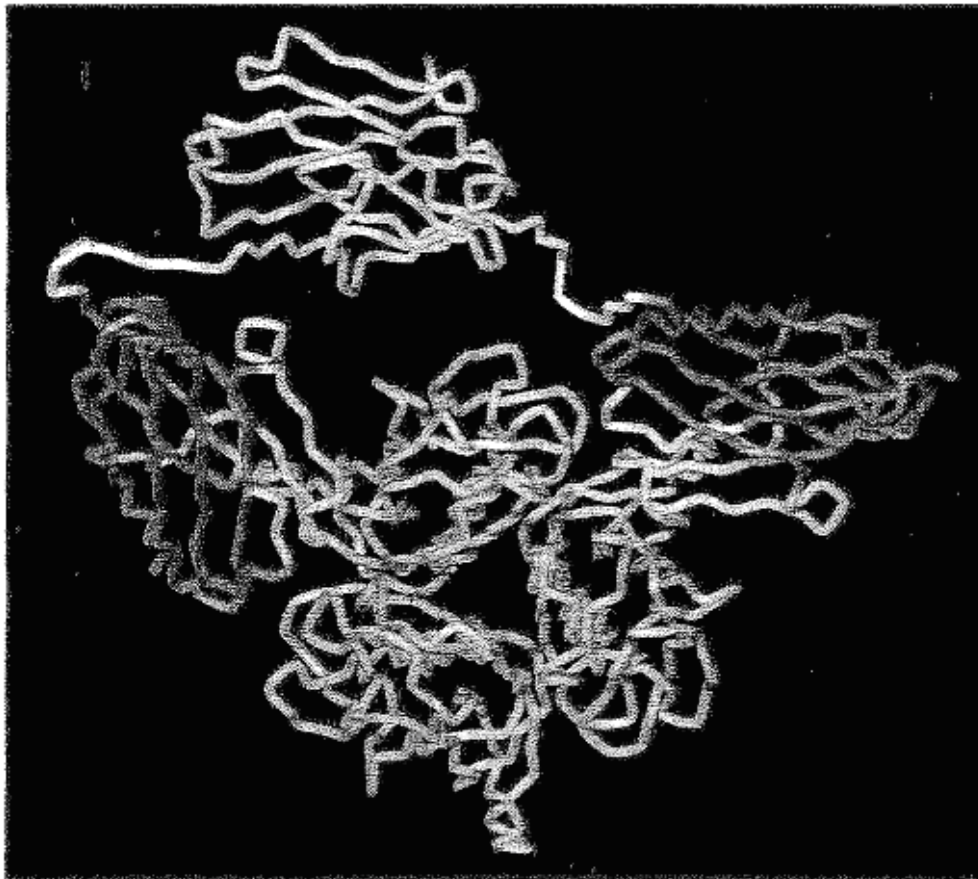


Figura 62