

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 034**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2010 PCT/EP2010/057921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10139808**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2010 E 10724497 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2438087**

54 Título: **Construcciones de Nanobody contra el virus respiratorio sincicial humano (VRSH) trivalentes para la prevención y/o el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias**

30 Prioridad:

05.06.2009 US 184396 P
30.11.2009 US 265014 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

73 Titular/es:

ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

DEPLA, ERIK;
STORTELEERS, CATELIJNE y
STAELENS, STEPHANIE

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 643 034 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

Construcciones de Nanobody contra el virus respiratorio sincicial humano (VRSh) trivalentes para la prevención y/o el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a secuencias de aminoácidos que están dirigidas contra/y o que pueden unirse específicamente (tal como se define en el presente documento) a proteína F de VRSh, así como a compuestos o construcciones, y en particular proteínas y polipéptidos, que comprenden o consisten esencialmente en una o más de tales secuencias de aminoácidos (también denominadas en el presente documento "secuencia(s) de aminoácidos de la invención", "compuesto(s) de la invención", "construcción/construcciones de la invención" y "polipéptido(s) de la invención", respectivamente).

10

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales secuencias de aminoácidos y polipéptidos (también denominados en el presente documento "ácido(s) nucleico(s) de la invención" o "secuencia(s) de nucleótidos de la invención"); a métodos para preparar tales secuencias de aminoácidos y polipéptidos; a células huésped que expresan o son capaces de expresar tales secuencias de aminoácidos o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales secuencias de aminoácidos, polipéptidos, compuestos o construcciones, ácidos nucleicos y/o células huésped; y a usos de tales secuencias de aminoácidos, polipéptidos, compuestos o construcciones, ácidos nucleicos, células huésped y/o composiciones, en particular para fines profilácticos y/o terapéuticos, tales como los fines profilácticos y/o terapéuticos mencionados en el presente documento.

20

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

25

Antecedentes de la técnica

El virus respiratorio sincicial humano (VRSh) es un miembro de la familia *Paramyxoviridae* y es un virus con envoltura con dos glucoproteínas de superficie principales que constituyen las espículas de la partícula vírica. Una de estas glucoproteínas (proteína G) es la proteína de unión que media en la unión del virus a la superficie celular. La otra glucoproteína (proteína F o fusión) media en la fusión de las membranas vírica y celular, permitiendo la entrada de la nucleocápside vírica en el citoplasma celular. La inhibición de las etapas mediadas por las glucoproteínas o bien G o bien F bloquea las fases iniciales del ciclo infeccioso y neutraliza la infectividad vírica. Por tanto, anticuerpos dirigidos contra o bien G o bien F, y que inhiben sus actividades respectivas, pueden neutralizar la infectividad vírica y pueden proteger contra la infección por VRSh. Wu *et al.*, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 317, 103 (2008) describen el desarrollo de palivizumab y motavizumab, anticuerpos monoclonales humanizados que se unen a la proteína F de VRS. La proteína F está altamente conservada y forma espículas triméricas que experimentan cambios conformacionales tras su activación.

35

40

Se han descrito diferentes anticuerpos (recombinantes) y fragmentos de anticuerpo (véase por ejemplo Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 23,1126 (2005), entre los cuales se encuentran dominios variables individuales de inmunoglobulinas producidos por camélidos (VHH) (Harmsen y De Haard, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13 (2007).

45

El VRSh es la causa principal de infecciones graves de las vías respiratorias bajas (bronquiolitis y neumonía) en lactantes y niños muy pequeños y provoca epidemias anuales durante los meses de invierno. El virus también provoca una carga de enfermedad sustancial entre los ancianos, y los adultos con estados de inmunosupresión y/o trastornos cardiopulmonares subyacentes también corren un riesgo de enfermedad por VRSh grave. La respuesta inmunitaria no previene las reinfecciones.

50

No hay ninguna vacuna disponible para prevenir las infecciones por VRSh. El único producto farmacológico disponible en el mercado es un anticuerpo monoclonal humanizado (Synagis[®]) dirigido contra una de las glucoproteínas víricas (proteína F) que se usa profilácticamente en niños que corren un riesgo muy alto de padecer una infección por VRSh grave. El uso restringido de Synagis[®] se debe, al menos en parte, al alto coste de este producto. Existe claramente la necesidad de agentes profilácticos y/o terapéuticos mejorados y/o más baratos para la prevención y o el tratamiento de infecciones por VRSh.

55

Sumario de la invención

60

La presente invención proporciona secuencias de aminoácidos (también denominadas "secuencia(s) de aminoácidos de la invención"), polipéptidos (también denominados "polipéptido(s) de la invención") y composiciones y compuestos terapéuticos que están dirigidos contra la proteína F de VRSh y que tienen propiedades profilácticas, terapéuticas y/o farmacológicas mejoradas, además de otras propiedades ventajosas (tales como, por ejemplo, facilidad de preparación mejorada y/o costes de bienes reducidos), en comparación con las secuencias de aminoácidos y anticuerpos de la técnica anterior. Estas propiedades ventajosas y mejoradas quedarán claras a partir

65

de la descripción adicional en el presente documento. Sin limitarse, las secuencias de aminoácidos, polipéptidos y composiciones y compuestos terapéuticos proporcionados por la invención pueden mostrar una estabilidad mejorada, menos inmunogenicidad, unión mejorada a proteína F de VRSh, afinidad y/o avidéz mejoradas por proteína F de VRSh, eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh (tal como se define en el presente documento), una selectividad aumentada por proteína F de VRSh y/o pueden ser capaces de bloquear parcialmente o de manera preferible totalmente la interacción de proteína F de VRSh con la célula huésped diana y/o su membrana. Pueden ser capaces de neutralizar VRSh modulando, inhibiendo y/o impidiendo la infectividad de VRSh, modulando, inhibiendo y/o impidiendo la fusión de VRSh con (la membrana celular de) la célula huésped diana, y/o modulando, inhibiendo y/o impidiendo la entrada de VRSh en la célula huésped diana (tal como se define en el presente documento). Pueden tener reactividad cruzada con y/o ser capaces de neutralizar diferentes cepas de VRSh y/o diferentes mutantes de escape de VRSh.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona varios tramos de residuos de aminoácido (tal como se define en el presente documento) que son particularmente adecuados para unirse a un epítipo específico en la proteína F de VRSh. Estos tramos de residuos de aminoácido pueden estar presentes en, y/o pueden incorporarse en, una secuencia de aminoácidos de la invención, en particular de tal modo que forman (parte de) el sitio de unión a antígeno de la secuencia de aminoácidos de la invención. Las secuencias de aminoácidos resultantes serán capaces de unirse a un epítipo específico en la proteína F de VRSh que se encuentra en, forma parte de o se solapa con (es decir, en la estructura primaria o terciaria) o está en proximidad estrecha de (es decir, en la estructura primaria o terciaria) el sitio antigénico II en la proteína F de VRSh (es decir, los residuos de aminoácido 250-275 de la proteína F de VRSh).

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona secuencias de aminoácidos que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, la presente divulgación proporciona secuencias de aminoácidos que comprenden dos o más tramos de residuos de aminoácido en los que un tramo se elige de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos un tramo se elige de:

c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la

secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

5 e) SEQ ID NO: 121; y

10 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

15 de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos de la invención y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

20 Incluso más preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de la invención comprenden tres o más tramos de residuos de aminoácido, en las que el primer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98; y

25 el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

b) SEQ ID NO: 102;

y el tercer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

30 c) SEQ ID NO: 121.

35 Secuencias de aminoácidos que comprenden uno o más de estos tramos específicos de residuos de aminoácido han mostrado propiedades mejoradas tales como por ejemplo características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), afinidad mejorada y/o avidéz mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh.

40 La secuencia de aminoácidos puede ser en particular un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), un anticuerpo de un único dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de un único dominio), un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb) o un Nanobody[®] (tal como se define en el presente documento, y que incluye pero no se limita a una secuencia de V_{HH}); otros dominios variables individuales, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos.

45 En este sentido, las secuencias de aminoácidos pueden consistir esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que CDR2 se elige de:

50 a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

55 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

65 Estas regiones determinantes de complementariedad preferidas (secuencias de CDR2) se denominan también "las CDR2 de la invención".

Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos pueden consistir esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que CDR2 se elige del grupo que consiste en:

5 a) SEQ ID NO: 102; o

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

10 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

20 y al menos una de CDR1 o CDR3 se elige de:

- CDR1 elegida del grupo que consiste en:

25 c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido; o

35 y/o

- CDR3 elegida del grupo que consiste en:

40 e) SEQ ID NO: 121; o

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

50 Incluso más preferiblemente, las secuencias de aminoácidos pueden consistir esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

55 a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

65 y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102; o

5 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

10 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

20 - CDR3 se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

25 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 En un aspecto específico, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende al menos SEQ ID NO: 102. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

40 La presente invención también proporciona varias secuencias de aminoácidos humanizadas que son particularmente adecuadas para unirse a la proteína F de VRSh. Las secuencias de aminoácidos de la presente invención muestran inmunogenicidad reducida tras la administración a un sujeto humano. Además, las secuencias de aminoácidos de la presente invención muestran otras propiedades mejoradas tales como por ejemplo características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de K_{aso} , y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) para proteína F de VRSh, afinidad mejorada y/o avidéz mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh en comparación con sus secuencias de aminoácidos de tipo natural correspondientes (tal como se describe en el documento WO 2009/147248).

45 Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos elegidas de las siguientes:

50 a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

55 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 60-76.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos elegidas de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

10 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

15 Secuencias de aminoácidos preferidas de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos elegidas de las siguientes:

20 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76.

En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos elegidas de las siguientes:

40 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

55 En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 146-153.

En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos elegidas de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la

secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Secuencias de aminoácidos preferidas de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

La presente invención proporciona varias secuencias de aminoácidos de secuencia optimizada y/o Nanobodies[®] que muestran estabilidad aumentada tras almacenamiento durante estudios de estabilidad y que son particularmente adecuadas para la unión a proteína F de VRSh. Las secuencias de aminoácidos de la presente invención muestran modificación postraduccional de piroglutamato reducida del extremo N y por tanto tienen una estabilidad de producto aumentada. Además, las secuencias de aminoácidos de la presente invención muestran otras propiedades mejoradas tales como por ejemplo menos inmunogenicidad, características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) para proteína F de VRSh, afinidad mejorada y/o avidéz mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh en comparación con sus secuencias de aminoácidos originales correspondientes (tal como se describe en el documento WO 2009/147248).

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, se proporcionan secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

Las secuencias de aminoácidos y Nanobodies[®] están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de una proteína o un polipéptido de la invención (también denominado "polipéptido de la invención" o "proteína de la invención"), que puede comprender o consistir esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] de la invención y que puede comprender

además opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] adicionales (todas unidas opcionalmente por medio de uno o más conectores adecuados).

5 La divulgación también se refiere a una proteína o un polipéptido (también denominado en el presente documento "polipéptido de la invención", respectivamente) que comprende o consiste esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención (o fragmentos adecuados de los mismos).

10 Por ejemplo, y sin limitación, la una o más secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] pueden usarse como unidad de unión en una proteína o un polipéptido de este tipo, para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiparatópico, respectivamente, todos tal como se describen en el presente documento. La presente divulgación también se refiere por tanto a un polipéptido que es una construcción monovalente que comprende o que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos o un Nanobody[®]. La presente divulgación también se refiere por tanto a un polipéptido que es un polipéptido multivalente, tal como por ejemplo un polipéptido bivalente o trivalente. La presente divulgación también se refiere a un polipéptido que es un polipéptido multiparatópico, tal como por ejemplo un polipéptido biparatópico o triparatópico.

15 En un aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención (tal como se describió anteriormente).

20 En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) elegidos de secuencias de aminoácidos que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de las siguientes:

25 a) SEQ ID NO: 102;

30 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) elegidos de secuencias de aminoácidos que comprenden dos o más tramos de residuos de aminoácido en los que un tramo se elige de los siguientes:

45 a) SEQ ID NO: 102;

50 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

55 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

60 y al menos un tramo se elige de:

c) SEQ ID NO: 98;

65 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que

comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

e) SEQ ID NO: 121; y

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos que forma parte del polipéptido multivalente y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

Polipéptidos multivalente preferidos (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) elegidos de secuencias de aminoácidos que comprenden tres o más tramos de residuos de aminoácido, en los que el primer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

o el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y el tercer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres

(preferiblemente idénticos) que consisten esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que CDR2 se elige de:

5 a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

10 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

20 Los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) polipéptidos pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que consisten esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que CDR2 se elige del grupo que consiste en:

25 a) SEQ ID NO: 102; o

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

30 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

40 y al menos una de CDR1 o CDR3 se elige de:

- CDR1 elegida del grupo que consiste en:

45 c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido; o

50 y/o

55 - CDR3 elegida del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121; o

60 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Preferiblemente, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que consisten esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102; o

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto específico, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que comprenden al menos SEQ ID NO: 102, preferiblemente que comprenden SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición

según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 65 y 76.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos

tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

5 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

30 En otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

35 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 65 y 76.

50 Un polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 62. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 65. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 76.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la

numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 146-153.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

En otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

5 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 146-153.

10 En otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

15 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

25 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

30 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

35 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

40 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

50 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

60 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos

tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

5 En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® elegido del grupo que consiste en SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

En otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® elegido de las siguientes:

- 10 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:
- 15 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
- 20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody elegido del grupo que consiste en SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

- 30 a) SEQ ID NO: 77-79 y 158;
- b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 77-79 y 158, siempre que:
- 35 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody® abarcado en dicho polipéptido tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y/o un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y
- 40 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

45 Los polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 77-79 y 158.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

- 50 a) SEQ ID NO: 78 y 79;
- b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 78 y 79, siempre que:
- 55 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody® abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y/o un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y
- 60 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

65 Polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 78 o 79.

En otro aspecto específico, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 77. En otro aspecto específico, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En otro aspecto específico, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79. En otro aspecto específico, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 158.

- 5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:
- a) SEQ ID NO: 159-161;
- 10 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:
- 15 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y
- 20 iii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 159-161.

- 25 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:
- a) SEQ ID NO: 159-161;
- 30 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:
- 35 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando el polipéptido tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:
- 40 - SEQ ID NO: 159, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- SEQ ID NO: 160, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- 45 - SEQ ID NO: 161, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;
- (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y
- 50 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

55 Polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 159-161.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

- 60 a) SEQ ID NO: 142-145 y 162-165;
- b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 142-145 y 162-165, siempre que:
- 65 i) la primera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 142-145 y 162-165.

Los polipéptidos con estas secuencias muestran propiedades ventajosas para su uso como agentes profilácticos, terapéuticos y/o farmacológicamente activos tales como por ejemplo estabilidad mejorada, menos inmunogenicidad, características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), afinidad mejorada y/o avidéz mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh.

La invención se refiere además a compuestos o construcciones, y en particular a proteínas o polipéptidos (también denominados en el presente documento "compuesto(s) de la invención") que comprenden o consisten esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y/o polipéptidos de la invención (o fragmentos adecuados de los mismos), y opcionalmente comprenden además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión. Tal como quedará claro para el experto a partir de la divulgación adicional en el presente documento, tales grupos, residuos, restos, unidades de unión o secuencias de aminoácidos adicionales pueden proporcionar o no funcionalidad adicional a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención (y/o al compuesto o construcción en el que está presente) y pueden modificar o no las propiedades de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] y/o polipéptido de la invención.

También está dentro del alcance de la divulgación usar partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de las secuencias de aminoácidos y/o polipéptidos de la invención, y/o usar proteínas o polipéptidos que comprenden o que consisten esencialmente en uno o más de tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados, siempre que sean adecuados para los usos previstos en el presente documento. Tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados contendrán habitualmente (al menos parte de) un sitio de unión a antígeno funcional para la unión al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh; y más preferiblemente será capaz de unirse específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh, e incluso más preferiblemente capaz de unirse al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento. Tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados tendrán también habitualmente una potencia y/o eficacia de neutralización de VRSh tal como se define en el presente documento. Algunos ejemplos no limitativos de tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos, derivados, proteínas y/o polipéptidos quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento. También pueden proporcionarse fragmentos o polipéptidos adicionales de la invención combinando adecuadamente (es decir, mediante unión o fusión genética) una o más partes o fragmentos (más pequeños) tal como se describe en el presente documento.

La invención también se refiere a ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos de la invención, un Nanobody[®] de la invención y/o un polipéptido de la invención (o un fragmento adecuado del mismo). Un ácido nucleico de este tipo también se denominará en el presente documento "ácido(s) nucleico(s) de la invención" y puede estar por ejemplo en forma de una construcción genética, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que está en forma de una construcción genética.

La invención se refiere además a un huésped o una célula huésped que expresa (o que en circunstancias adecuadas es capaz de expresar) una secuencia de aminoácidos de la invención, un Nanobody[®] de la invención, un polipéptido de la invención y/o un compuesto o construcción de la invención; y/o que contiene un ácido nucleico de la invención. Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de tales huéspedes o células huésped quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

La invención se refiere además a un producto o una composición que contiene o que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la invención (o un fragmento adecuado de la misma), al menos un polipéptido de la invención, al menos un compuesto o construcción de la invención y/o al menos un ácido nucleico de la invención, y opcionalmente uno o más componentes adicionales de tales composiciones conocidos *per se*, es decir, dependiendo del uso previsto de la composición. Un producto o una composición de este tipo puede ser por ejemplo una composición farmacéutica (tal como se describe en el presente documento) o una composición veterinaria. Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de tales productos o composiciones quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

La invención se refiere además a métodos para preparar las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos,

ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento.

La invención se refiere además a aplicaciones y usos de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento, así como a métodos para la prevención y/o el tratamiento de la infección de las vías respiratorias provocada por VRSh. Algunas aplicaciones y usos preferidos pero no limitativos quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención pueden usarse generalmente para bloquear la interacción de la proteína F de VRSh con la célula huésped diana y/o su membrana, para neutralizar VRSh (diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh), para modular, inhibir y/o prevenir la infectividad de VRSh (de diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh), para modular, inhibir y/o prevenir la fusión (de diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh) con (la membrana celular de) la célula huésped diana y/o para modular, inhibir y/o prevenir la entrada de VRSh en la célula huésped diana (de diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh).

Como tal, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con infección por VRSh. Los ejemplos de tales enfermedades y trastornos asociados con infección por VRSh quedarán claros para el experto basándose en la divulgación en el presente documento, y por ejemplo incluyen las siguientes enfermedades y trastornos: enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y asma.

Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y/o asma provocadas por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de aminoácidos de la invención, Nanobody[®] de la invención, polipéptido de la invención, compuesto o construcción de la invención o construcción monovalente de la invención, o una composición de la invención.

La invención también se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos de la invención, un Nanobody[®] de la invención, un polipéptido de la invención, un compuesto o construcción de la invención o un construcción monovalente en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y/o asma; y/o para su uso en uno o más de los métodos descritos en el presente documento.

La invención también se refiere a una secuencia de aminoácidos de la invención, un Nanobody[®] de la invención, un polipéptido de la invención, un compuesto o construcción de la invención o construcción monovalente para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y/o asma.

Otras aplicaciones y usos de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y compuestos y composiciones de la invención quedarán claros para el experto a partir de la divulgación adicional en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: ELISA de competencia: Fab de Synagis[®] compete con Fab de Numax y Nanobodies[®] de unión a VRS purificados por la unión a la proteína F_{TM}. tal como se describe en el ejemplo 8. Nanobody[®] 202A5 es un Nanobody[®] irrelevante que se une a HA de influenza.

Figura 2: Unión de Nanobodies[®] monovalentes, bivalentes y trivalentes a proteína F_{TM}. tal como se describe en el ejemplo 10.

Figuras 3A y B: Potencia (neutralización de VRS) de construcciones monovalentes, bivalentes y trivalentes para neutralizar las cepas de VRS Long y B-1 tal como se describe en el ejemplo 11.

Figura 4: Ensayo de neutralización de VRS Long y los mutantes de escape R7C2/1; R7C2/11 y R7.936/4 por los Nanobodies[®] monovalentes 7B2 (A), 15H8, (B) NC41 (C) en un intervalo de concentración de desde aproximadamente 2 μM hasta 6 nM y los Nanobodies[®] trivalentes RSV 400 (D), RSV404 (E), RSV 407 (F) y RSV 403 (G) en un intervalo de concentración de aproximadamente 20 nM a 100 pM. Se realizó sólo el ajuste de la curva para datos de Nanobodies[®] monovalentes.

Figura 5: Neutralización de las cepas VRS Long y VRS B-1 por el Nanobody® trivalente NC41 con diferentes longitudes de conector tal como se describe en el ejemplo 15.

5 Figura 6: Visión general esquemática de los residuos humanizados introducidos en variantes de NC41 seleccionadas. Los puntos indican la presencia del residuo de tipo natural; las letras corresponden al residuo humanizado. La numeración es según Kabat.

Figura 7: Alineación de secuencias de Nanobody® humanizadas preferidas de la invención.

10 Figura 8: Neutralización de la cepa Long y la cepa B-1 de VRSh por variantes de NC41 humanizadas monovalentes y trivalentes. En la figura 8A, se compara la neutralización por dos de las variantes de NC41 humanizadas trivalentes (RSV414 y RSV426) con sus correspondientes Nanobodies® monovalentes. La figura 8B muestra la neutralización por las variantes de NC41 trivalentes (RSV414, RSV426 y RSV427).

15 Figura 9: Neutralización de las cepas Long (A) y B-1 (B) de VRSh por RSV407 y RSV434.

Figura 10: Pruebas de eficacia (profiláctica) de RSV407 en el modelo de rata algodónera tal como se describe en el ejemplo 21. Se les administraron por vía intranasal a las ratas diversas concentraciones de RSV407 (día -1) 24 horas antes de la infección por VRS (día 0). Se determinó el título vírico (izquierda, media \pm E.E.M., n=6) y se determinó el nivel de ARN vírico (derecha) en lavados de pulmón al nivel pico de viremia, que es el día 4 tras la infección (*= P<0,05 en prueba de la t de Student bilateral frente a sin tratar).

20 Figura 11: Pruebas de eficacia (terapéutica) de RSV434 en modelo de rata algodónera tal como se describe en el ejemplo 21. Se infectaron las ratas con VRS el día 0 y se trataron con 0, 1, 2, 4 o 20 mg/kg de RSV434 los días 2 y 3 mediante instilación intranasal (n=6). Se determinó el título vírico en lavados nasales (A) y de pulmón (B) al nivel pico de viremia (día 4 tras la infección). Las líneas horizontales muestran los límites de detección.

Descripción detallada de la invención

30 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Adicionalmente, en la presente descripción, ejemplos y reivindicaciones:

35 a) A menos que se indique o se defina de otro modo, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que quedará claro para el experto. Se hace referencia por ejemplo a los manuales convencionales mencionados en el párrafo a) en la página 46 del documento WO 08/020079.

40 b) A menos que se indique de otro modo, los términos “secuencia de inmunoglobulina”, “secuencia”, “secuencia de nucleótidos” y “ácido nucleico” son tal como se describen en el párrafo b) en la página 46 del documento WO 08/020079.

45 c) A menos que se indique de otro modo, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se*, tal como quedará claro para el experto. Se hace referencia por ejemplo de nuevo a los manuales convencionales y los antecedentes generales de la técnica mencionados en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en el mismo; así como a por ejemplo las siguientes revisiones Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin y Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving *et al.*, J. Immunol. Methods, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz *et al.*, Placenta, 2000, 21 supl. A, S106-12, Gonzales *et al.*, Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43, que describen técnicas para la ingeniería de proteínas, tales como maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.

50 d) Los residuos de aminoácido se indicarán según el código de aminoácidos de una letra o de tres letras convencional. Se hace referencia a la tabla A-2 en la página 48 del documento WO 08/020079.

55 e) Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos “comprende” otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o que “consiste esencialmente en” otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, esto tiene el significado facilitado en el párrafo i) en las páginas 51-52 del documento WO 08/020079.

60 f) El término “en forma esencialmente aislada” tiene el significado facilitado al mismo en el párrafo j) en las páginas 52 y 53 del documento WO 08/020079.

65 g) Los términos “dominio” y “dominio de unión” tienen los significados facilitados a los mismos en el párrafo k) en la página 53 del documento WO 08/020079.

h) Los términos “determinante antigénico” y “epitopo”, que también pueden usarse de manera intercambiable en el

presente documento, tienen los significados facilitados a los mismos en el párrafo l) en la página 53 del documento WO 08/020079.

5 i) Tal como se describirá adicionalmente en el párrafo m) en la página 53 del documento WO 08/020079, una secuencia de aminoácidos (tal como un Nanobody[®], un anticuerpo, un polipéptido de la invención o generalmente una proteína o un polipéptido de unión a antígeno o un fragmento del mismo) que puede unirse (específicamente) a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína específico (o por al menos a una parte, fragmento o epítipo del mismo) se dice que es “contra” o “está dirigido contra” dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

10 j) El término “especificidad” tiene el significado facilitado al mismo en el párrafo n) en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079; y tal como se menciona en el mismo se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos a los que puede unirse una molécula de unión a antígeno o molécula de proteína de unión a antígeno particular (tal como un Nanobody[®] o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en la afinidad y/o avidéz, tal como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079 (incorporado al presente documento como referencia), que también describe algunas técnicas preferidas para medir la unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un Nanobody[®] o polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente. Normalmente, las proteínas de unión a antígeno (tales como las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y/o polipéptidos de la invención) se unirán a su antígeno con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litros/moles). Cualquier valor de K_D mayor de 10^4 moles/litro (o cualquier valor de K_A menor de 10^4 M⁻¹) litros/mol se considera generalmente que indica unión no específica. Preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina monovalente de la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como por ejemplo de entre 10 y 5 nM. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competencia de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas *per se* en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente documento. Tal como quedará claro para el experto, y tal como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079, la constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente. Los métodos para determinar la constante de disociación quedarán claros para el experto, e incluyen por ejemplo las técnicas mencionadas en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079.

35 k) La semivida de una secuencia de aminoácidos, un compuesto o polipéptido de la invención puede definirse generalmente tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 y tal como se menciona en el mismo se refiere al tiempo que tarda la concentración en suero de la secuencia de aminoácidos, el compuesto o polipéptido en reducirse en un 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a degradación de la secuencia de aminoácidos, el compuesto o polipéptido y/o aclaramiento o secuestro de la secuencia de aminoácidos, el compuesto o polipéptido mediante mecanismos naturales. La semivida *in vivo* de una secuencia de aminoácidos, un compuesto o polipéptido de la invención puede determinarse de cualquier manera conocida *per se*, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas quedarán claras para el experto en la técnica, y pueden ser por ejemplo generalmente tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079. Tal como se menciona también en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079, la semivida puede expresarse usando parámetros tales como el t_{1/2}-alfa, t_{1/2}-beta y el área bajo la curva (AUC). Se hace referencia por ejemplo a la parte experimental más adelante, así como a los manuales convencionales, tales como Kennet, A *et al.*: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y Peters *et al.*, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Se hace referencia también a “Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2.^a edición rev. (1982). Los términos “aumento de la semivida” o “semivida aumentada” también como se definen en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 y en particular se refieren a un aumento de t_{1/2}-beta, o bien con o bien sin un aumento de t_{1/2}-alfa y/o AUC o ambos.

55 l) Con respecto a una diana o un antígeno, el término “sitio de interacción” en la diana o el antígeno significa un sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o el antígeno que es un sitio para la unión a un receptor u otra pareja de unión, un sitio catalítico, un sitio de escisión, un sitio para interacción alostérica, un sitio implicado en polimerización (tal como homomerización o heterodimerización) de la diana o el antígeno; o cualquier otro sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o el antígeno que está implicado en una acción biológica o mecanismo de la diana o el antígeno. Más generalmente, un “sitio de interacción” puede ser cualquier sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o el antígeno al que puede unirse una secuencia de aminoácidos o un polipéptido de la invención de manera que la diana o el antígeno (y/o cualquier ruta, interacción, señalización, mecanismo biológico o efecto biológico en el que está implicado la diana o el antígeno) se modula (tal como se define en el presente documento).

65 m) Se dice que una secuencia de aminoácidos o polipéptido es “específico para” una primera diana o antígeno en

comparación con una segunda diana o antígeno cuando se une al primer antígeno con una afinidad (tal como se describió anteriormente, y expresada adecuadamente como valor de K_D , valor de K_A , velocidad de K_{dis} , y/o velocidad de K_{aso} .) que es mejor en al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces, y preferiblemente al menos 1000 veces, y hasta 10000 veces o más que la afinidad con la que dicha secuencia de aminoácidos o polipéptido se une a la segunda diana o antígeno. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos o el polipéptido puede unirse a la primera diana o antígeno con un valor de K_D que es al menos 10 veces menor, tal como al menos 100 veces menor, y preferiblemente al menos 1000 veces menor, tal como 10.000 veces menor o incluso menor de eso, que la K_D con la que dicha secuencia de aminoácidos o polipéptido se une a la segunda diana o antígeno. Preferiblemente, cuando una secuencia de aminoácidos o polipéptido es “específico para” una primera diana o antígeno en comparación con una segunda diana o antígeno, está dirigido contra (tal como se define en el presente documento) dicha primera diana o antígeno, pero no está dirigido contra dicha segunda diana o antígeno.

n) Los términos “bloquear (de manera cruzada)”, “bloqueado (de manera cruzada)” y “bloqueo (cruzado)” se usan de manera intercambiable en el presente documento para significar la capacidad de una secuencia de aminoácidos u otro agente de unión (tal como un polipéptido de la invención) para interferir en la unión de otras secuencias de aminoácidos o agentes de unión de la invención con una diana dada. El grado en el que una secuencia de aminoácidos u otros agentes de unión de la invención son capaces de interferir en la unión de otro a la diana, y por tanto si puede decirse que bloquea de manera cruzada según la invención, puede determinarse usando ensayos de unión de competencia. Un ensayo de bloqueo cruzado cuantitativo particularmente adecuado usa una máquina de Biacore que puede medir el grado de las interacciones usando tecnología de resonancia de plasmón superficial. Otro ensayo de bloqueo cruzado cuantitativo adecuado usa un enfoque basado en ELISA para medir la competencia entre secuencias de aminoácidos u otros agentes de unión en cuanto a su unión a la diana.

Lo siguiente describe generalmente un ensayo de Biacore adecuado para determinar si una secuencia de aminoácidos u otro agente de unión bloquea de manera cruzada o es capaz de bloquear de manera cruzada según la invención. Se apreciará que el ensayo puede usarse con cualquiera de las secuencias de aminoácidos u otros agentes de unión descritos en el presente documento. La máquina de Biacore (por ejemplo, Biacore 3000) se hace funcionar en línea con las recomendaciones del fabricante. Por tanto en un ensayo de bloqueo cruzado, la proteína diana se acopla a un chip CM5 Biacore usando química de acoplamiento de amina convencional para generar una superficie que está recubierta con la diana. Normalmente se acoplarían 200-800 unidades de resonancia de la diana al chip (una cantidad que proporciona fácilmente niveles de unión medibles pero que es fácilmente saturable mediante las concentraciones del reactivo de prueba que está usándose). Dos secuencias de aminoácidos de prueba (denominadas A* y B*) que van a evaluarse para determinar su capacidad de bloquearse de manera cruzada entre sí se mezclan a una razón molar de uno a uno de sitios de unión en un tampón adecuado para crear la mezcla de prueba. Cuando se calculan las concentraciones en una base de sitios de unión se supone que el peso molecular de una secuencia de aminoácidos es el peso molecular total de la secuencia de aminoácidos dividido entre el número de sitios de unión de la diana en esa secuencia de aminoácidos. La concentración de cada secuencia de aminoácidos en la mezcla de prueba debe ser lo suficientemente alta como para saturar fácilmente los sitios de unión para esa secuencia de aminoácidos en las moléculas diana capturadas en el chip de Biacore. Las secuencias de aminoácidos en la mezcla están a la misma concentración molar (en una base de unión) y esa concentración será normalmente de entre 1,00 y 1,5 micromolar (en una base de sitios de unión). También se preparan disoluciones separadas que contienen A* solo y B* solo. A* y B* en estas disoluciones deben estar en el mismo tampón y a la misma concentración que en la mezcla de prueba. La mezcla de prueba se hace pasar sobre el chip de Biacore recubierto con la diana y se registra la cantidad de unión total. El chip se trata entonces de un modo tal que se retiran las secuencias de aminoácidos unidas sin dañar la diana unida al chip. Normalmente esto se realiza tratando el chip con HCl 30 mM durante 60 segundos. La disolución de A* solo se hace pasar entonces sobre la superficie recubierta con la diana y se registra la cantidad de unión. El chip se trata de nuevo para retirar todas las secuencias de aminoácidos unidas sin dañar la diana unida al chip. La disolución de B* solo se hace pasar entonces sobre la superficie recubierta con la diana y se registra la cantidad de unión. A continuación se calcula la unión teórica máxima de la mezcla de A* y B*, y es la suma de la unión de cada secuencia de aminoácidos cuando se hace pasar sobre la superficie de la diana sola. Si la unión registrada real de la mezcla es menor que este máximo teórico, entonces las dos secuencias de aminoácidos se bloquean de manera cruzada entre sí. Por tanto, en general, una secuencia de aminoácidos de bloqueo cruzado u otro agente de unión según la invención es aquel que se unirá a la diana en el ensayo de bloqueo cruzado Biacore anterior de manera que durante el ensayo y en presencia de una segunda secuencia de aminoácidos u otro agente de unión de la invención la unión registrada es de entre el 80% y el 0,1% (por ejemplo, del 80% al 4%) de la unión teórica máxima, específicamente entre el 75% y el 0,1% (por ejemplo, del 75% al 4%) de la unión teórica máxima, y más específicamente entre el 70% y el 0,1% (por ejemplo, del 70% al 4%) de la unión teórica máxima (justo tal como se definió anteriormente) de las dos secuencias de aminoácidos o agentes de unión en combinación. El ensayo Biacore descrito anteriormente es un ensayo primario usado para determinar si secuencias de aminoácidos u otros agentes de unión se bloquean de manera cruzada entre sí según la invención. En raras ocasiones, secuencias de aminoácidos particulares u otros agentes de unión pueden no unirse a una diana acoplada por medio de química de amina a un chip CM5 Biacore (esto se produce habitualmente cuando el sitio de unión relevante en la diana se enmascara o se destruye por el acoplamiento al chip). En tales casos, el bloqueo cruzado puede determinarse usando una versión etiquetada de la diana, por ejemplo una versión etiquetada con His N-terminal. En este formato particular, se acoplaría una secuencia de aminoácidos anti-His al chip de Biacore y entonces se haría pasar la diana etiquetada con His sobre la superficie

del chip y se capturaría por la secuencia de aminoácidos anti-His. El análisis del bloqueo cruzado se llevaría a cabo esencialmente tal como se describió anteriormente, excepto porque tras cada ciclo de regeneración del chip, se cargaría nueva diana etiquetada con His de vuelta en la superficie recubierta con la secuencia de aminoácidos anti-His. Además del ejemplo facilitado usando diana etiquetada con His N-terminal, podría usarse alternativamente diana etiquetada con His C-terminal. Además, podrían usarse otras diversas combinaciones de etiquetas y proteínas de unión a etiqueta que se conocen en la técnica para un análisis de bloqueo cruzado de este tipo (por ejemplo, etiqueta de HA con anticuerpos anti-HA; etiqueta FLAG con anticuerpos anti-FLAG; etiqueta de biotina con estreptavidina).

Lo siguiente describe generalmente un ensayo ELISA para determinar si una secuencia de aminoácidos u otro agente de unión dirigido contra una diana bloquea de manera cruzada o es capaz de bloquear de manera cruzada tal como se define en el presente documento. Se apreciará que el ensayo puede usarse con cualquiera de las secuencias de aminoácidos (u otros agentes de unión tales como polipéptidos de la invención) descritas en el presente documento. El principio general del ensayo es tener una secuencia de aminoácidos o agente de unión que está dirigido contra la diana recubierta sobre los pocillos de una placa para ELISA. Se añade una cantidad en exceso de una segunda secuencia de aminoácidos anti-diana, que potencialmente bloquea de manera cruzada, en disolución (es decir, no unida a la placa para ELISA). Se añade entonces una cantidad limitada de la diana a los pocillos. La secuencia de aminoácidos recubierta y la secuencia de aminoácidos en disolución compiten por la unión del número limitado de moléculas diana. Se lava la placa para retirar la diana en exceso que no se ha unido mediante la secuencia de aminoácidos recubierta y para retirar también la segunda secuencia de aminoácidos en fase de disolución así como cualquier complejo formado entre la segunda secuencia de aminoácidos en fase de disolución y la diana. La cantidad de diana unida se mide entonces usando un reactivo que es apropiado para detectar la diana. Una secuencia de aminoácidos en disolución que es capaz de bloquear de manera cruzada la secuencia de aminoácidos recubierta será capaz de provocar una disminución del número de moléculas diana a las que puede unirse la secuencia de aminoácidos recubierta con respecto al número de moléculas diana con las que puede unirse la secuencia de aminoácidos recubierta en ausencia de la segunda secuencia de aminoácidos en fase de disolución. En el caso en el que la primera secuencia de aminoácidos, por ejemplo un Ac-X, se elige para que sea la secuencia de aminoácidos inmovilizada, se recubre sobre los pocillos de la placa para ELISA, tras lo cual las placas se bloquean con una disolución de bloqueo adecuada para minimizar la unión no específica de reactivos que se añaden posteriormente. Se añade entonces una cantidad en exceso de la segunda secuencia de aminoácidos, es decir Ac-Y, a la placa para ELISA de manera que los moles de sitios de unión de la diana de Ac-Y por pocillo son al menos 10 veces superiores a los moles de sitios de unión de la diana de Ac-X que se usaron, por pocillo, durante el recubrimiento de la placa para ELISA. Entonces se añade la diana de manera que los moles de la diana añadidos por pocillo son al menos 25 veces inferiores a los moles de sitios de unión de la diana de Ac-X que se usaron para recubrir cada pocillo. Tras un periodo de incubación adecuado, se lava la placa para ELISA y se añade un reactivo para detectar la diana para medir la cantidad de diana unida específicamente mediante la secuencia de aminoácidos anti-diana recubierta (en este caso Ac-X). La señal de fondo para el ensayo se define como la señal obtenida en pocillos con la secuencia de aminoácidos recubierta (en este caso Ac-X), la segunda secuencia de aminoácidos en fase de disolución (en este caso Ac-Y), tampón de diana sólo (es decir, sin diana) y reactivos de detección de diana. La señal de control positivo para el ensayo se define como la señal obtenida en pocillos con la secuencia de aminoácidos recubierta (en este caso Ac-X), el tampón de la segunda secuencia de aminoácidos en fase de disolución sólo (es decir, sin la segunda secuencia de aminoácidos en fase de disolución), la diana y reactivos de detección de diana. El ensayo ELISA puede ejecutarse de una manera tal que se tiene que la señal de control positivo es al menos 6 veces la señal de fondo. Para evitar cualquier artefacto (por ejemplo, afinidades significativamente diferentes entre Ac-X y Ac-Y por la diana) que resulte de la elección de cuál secuencia de aminoácidos usar como secuencia de aminoácidos de recubrimiento y cuál usar como segunda secuencia de aminoácidos (competidora), el ensayo de bloqueo cruzado puede ejecutarse en dos formatos: 1) el formato 1 es cuando Ac-X es la secuencia de aminoácidos que se recubre sobre la placa para ELISA y Ac-Y es la secuencia de aminoácidos competidora que está en disolución y 2) el formato 2 es cuando Ac-Y es la secuencia de aminoácidos que se recubre sobre la placa para ELISA y Ac-X es la secuencia de aminoácidos competidora que está en disolución. Ac-X y Ac-Y se definen como que bloquean de manera cruzada si, o bien en el formato 1 o bien en el formato 2, la secuencia de aminoácidos anti-diana en fase de disolución es capaz de provocar una reducción de entre el 60% y el 100%, específicamente entre el 70% y el 100%, y más específicamente entre el 80% y el 100%, de la señal de detección de diana (es decir, la cantidad de diana unida mediante la secuencia de aminoácidos recubierta) en comparación con la señal de detección de diana obtenida en ausencia de la secuencia de aminoácidos anti-diana en fase de disolución (es decir, los pocillos de control positivo).

o) Se dice que una secuencia de aminoácidos es "reactiva de manera cruzada" para dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes (tales como por ejemplo albúmina sérica de dos especies de mamífero diferentes, tales como por ejemplo seroalbúmina humana y seroalbúmina de *cyno*, tales como por ejemplo proteína F de diferentes cepas de VRSh, tales como por ejemplo proteína F de diferentes mutantes de escape de VRSh) si es específica para (tal como se define en el presente documento) ambos de estos antígenos o determinantes antigénicos diferentes.

p) Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el número total de residuos de aminoácido en un Nanobody[®] puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente de 112-115 y es lo más preferiblemente de 113. Sin embargo, debe indicarse que las partes, los fragmentos, análogos o derivados (tal como se describe

adicionalmente en el presente documento) de un Nanobody[®] no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales explicados resumidamente en el presente documento y sean también preferiblemente adecuados para los fines descritos en el presente documento.

5 q) Tal como se describirá adicionalmente en el párrafo q) en las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079 (incorporado al presente documento como referencia), los residuos de aminoácido de un Nanobody[®] se numeran según la numeración general para dominios de V_H facilitada por Kabat *et al.* (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), tal como se aplica a dominios de V_{HH} de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, J. *Immunol. Methods* 23 de junio de 2000: 240 (1-2): 185-195 (véase por ejemplo la figura 2 de esta publicación), y por consiguiente FR1 de un Nanobody[®] comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 1-30, CDR1 de un Nanobody[®] comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-35, FR2 de un Nanobody[®] comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un Nanobody[®] comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, FR3 de un Nanobody[®] comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 66-94, CDR3 de un Nanobody[®] comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102 y FR4 de un Nanobody[®] comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 103-113.

20 r) En el contexto de la presente invención “célula huésped diana (de un virus)” se refiere generalmente a una célula particular, que es o se deriva de un sujeto vivo y que es susceptible a la infección por dicho virus.

s) El término “infectividad de un virus”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción de sujetos vivos que, cuando se exponen a dicho virus, se infectan realmente por dicho virus.

25 t) El término “neutralización de un virus”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la modulación y/o reducción y/o prevención y/o inhibición de la infectividad (tal como se define en el presente documento) de un virus mediante unión de un compuesto neutralizante al virión, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tal como por ejemplo el ensayo de microneutralización descrito por Anderson *et al.* 1985 (*J. Clin. Microbiol.* 22: 1050-1052) y 1988 (*J. Virol.* 62: 4232-4238), modificaciones de estos ensayos tal como se describe por ejemplo en el ejemplo 6; un ensayo de reducción de placas de lisis tal como se describe por ejemplo por Johnson *et al.* 1997 (*J. Inf. Dis.* 176: 2215-2224), y modificaciones de los mismos y las mencionadas en el presente documento). En particular, “neutralización (de un virus)” o “neutralizar (un virus)” puede significar o bien modular, reducir, prevenir o bien inhibir la infectividad (tal como se define en el presente documento) de un virus tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento), en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o el 90% o más, en comparación con la infectividad normal (es decir, que se produce de manera natural) (tal como se define en el presente documento) de un virus, en el mismo ensayo en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención.

40 u) El término “potencia de una secuencia de aminoácidos de la invención”, “potencia de un Nanobody[®] de la invención”, “potencia de un polipéptido de la invención” y/o “potencia de compuesto o construcción de la invención”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de dicha secuencia de aminoácidos de la invención, Nanobody[®] de la invención, polipéptido de la invención y/o compuesto o construcción de la invención para neutralizar un virus particular (tal como por ejemplo VRSh), para modular, inhibir y/o prevenir la infectividad de un virus, para modular, inhibir y/o prevenir la fusión de un virus con (la membrana celular de) la célula huésped diana, y/o para modular, inhibir y/o prevenir la entrada de un virus en la célula huésped diana (tal como se define en el presente documento). La potencia puede medirse mediante cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica o descrito en el presente documento, tal como por ejemplo los ensayos de microneutralización descritos en la sección de ejemplos y/o los ensayos mencionados en el punto t) anteriormente.

50 v) El término “unión del virus”, tal como se usa en el presente documento, es la unión de un virus (por ejemplo, VRSh) a una célula huésped diana directamente (por ejemplo, interactuando con un receptor vírico) o indirectamente (por ejemplo, mediando en la interacción de una o más de otras proteínas o moléculas a un receptor vírico).

55 w) El término “fusión del virus”, tal como se usa en el presente documento, es la fusión de un virus (por ejemplo, VRSh) a una célula huésped diana directamente (por ejemplo, interactuando con compuestos de la membrana de la célula huésped diana) o indirectamente (por ejemplo, mediando en la interacción de una o más de otras proteínas o moléculas con compuestos de la membrana de la célula huésped diana).

60 x) El término “entrada vírica” usado en el presente documento abarca cualquier ruta biológica mediada por virus que es necesaria para lograr la unión del virión a una célula huésped diana y/o la fusión vírica con una célula huésped diana.

65 y) Un “tramo de residuos de aminoácido” significa dos o más residuos de aminoácido que son adyacentes entre sí o están en proximidad estrecha entre sí, es decir en la estructura primaria o terciaria de la secuencia de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, el “tramo de residuos de aminoácido” será responsable (al menos

parcialmente) de la unión de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], polipéptido, compuesto o construcción de la invención al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh.

5 z) Cuando se comparan dos tramos de residuos de aminoácido (o dos secuencias de CDR), el término “diferencia de aminoácido” se refiere a una inserción, deleción o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición del tramo de residuos de aminoácido (o secuencia de CDR) especificada en b), d) o f), en comparación con el tramo de residuos de aminoácido (o secuencia de CDR) de respectivamente a), c) o e); entendiéndose que el tramo de residuos de aminoácido (o secuencia de CDR) de b), d) y f) puede contener una, dos o como máximo tres de tales diferencias de aminoácido en comparación con el tramo de residuos de aminoácido de respectivamente a), c) o e).
 10 La “diferencia de aminoácido” puede ser una cualquiera, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones y/o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, que o bien mejoran las propiedades de la secuencia de aminoácidos de la invención o que al menos no reducen demasiado las propiedades deseadas o el equilibrio o combinación de propiedades deseadas de la secuencia de aminoácidos de la invención. En este sentido, la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe unirse al menos a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende el uno o más tramos de residuos de aminoácido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones y/o inserciones, midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial; y/o la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe tener al menos una potencia que es igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende el uno o más tramos de residuos de aminoácido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones y/o inserciones. El experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones, deleciones y/o inserciones adecuadas, o combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones, deleciones o inserciones y determinar su influencia sobre las propiedades de las secuencias de aminoácidos así obtenidas. Por ejemplo, y dependiendo del organismo huésped usado para expresar la secuencia de aminoácidos de la invención, tales deleciones y/o sustituciones pueden estar diseñadas de un modo tal que se eliminan uno o más sitios para la modificación postraduccional (tales como uno o más sitios de glucosilación), tal como estará dentro de la capacidad del experto en la técnica.

30 En un aspecto preferido de la invención, la “diferencia de aminoácido” es una sustitución de aminoácido. La sustitución de aminoácido puede ser una cualquiera, dos o como máximo tres sustituciones que o bien mejoran las propiedades de la secuencia de aminoácidos de la invención o que al menos no reducen demasiado las propiedades deseadas o el equilibrio o la combinación de propiedades deseadas de la secuencia de aminoácidos de la invención. En este sentido, la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe unirse al menos a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende el uno o más tramos de residuos de aminoácido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial; y/o la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe al menos tener una potencia que es igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende el uno o más tramos de residuos de aminoácido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones y/o inserciones. El experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones adecuadas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones y determinar su influencia sobre las propiedades de los Nanobodies[®] así obtenidos. La sustitución de aminoácido en el uno o más tramos de residuos de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácido conservativa. Las sustituciones de aminoácidos “conservativas” son generalmente sustituciones de aminoácidos en las que se reemplaza un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas de la secuencia de aminoácidos resultante. Tales sustituciones de aminoácidos conservativas se conocen bien en la técnica, por ejemplo a partir de los documentos WO 04/037999, GB-A-3 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y pueden seleccionarse tipos y/o combinaciones (preferidos) de tales sustituciones basándose en las enseñanzas pertinentes del documento WO 04/037999 así como el documento WO 98/49185 y a partir de las referencias adicionales citadas en los mismos.

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

60 Sustituciones conservativas particularmente preferidas son las siguientes: Ala a Gly o a Ser; Arg a Lys; Asn a Gln o a His; Asp a Glu; Cys a Ser; Gln a Asn; Glu a Asp; Gly a Ala o a Pro; His a Asn o a Gln; Ile a Leu o a Val; Leu a Ile o a Val; Lys a Arg, a Gln o a Glu; Met a Leu, a Tyr o a Ile; Phe a Met, a Leu o a Tyr; Ser a Thr; Thr a Ser; Trp a Tyr; Tyr a Trp; y/o Phe a Val, a Ile o a Leu. La sustitución de aminoácido en el uno o más tramos de residuos de aminoácido puede dotar a la secuencia de aminoácidos de afinidad aumentada por la unión a la proteína F de VRSh. Esto puede realizarse mediante técnicas tales como mutagénesis al azar o dirigida al sitio y/u otras técnicas para la maduración por afinidad conocidas *per se*, tales como por ejemplo las descritas en los documentos WO 09/004065, WO

05/003345, WO 06/023144, EP527809, EP397834.

Sin limitarse, las reglas (seguidas de manera parcial o completa) para las sustituciones de residuos de aminoácido en las CDR pueden ser las siguientes (es decir, sustitución por aminoácidos con químicas de cadena lateral similares):

- 5 - K se sustituye por R;
- R se sustituye por K;
- 10 - A se sustituye por S o T;
- S se sustituye por A o T;
- 15 - T se sustituye por A o S;
- I se sustituye por L o V;
- L se sustituye por I o V;
- 20 - V se sustituye por I o L;
- F se sustituye por Y;
- 25 - Y se sustituye por F;
- N se sustituye por D;
- D se sustituye por N;
- 30 - Q se sustituye por E;
- E se sustituye por Q;
- 35 - G se sustituye por A;
- M se sustituye por L;
- H, C, W y P se mantienen constantes.
- 40 Además, y también sin limitación, las reglas (seguidas de manera parcial o completa) para sustituciones de residuos de aminoácido en las CDR pueden ser alternativamente tal como sigue para sustituciones en las posiciones 27 a 35 y las posiciones 50 a 58 (usando el sistema de numeración de Kabat), en las que para las posiciones 27 a 35:
- 45 - El residuo de aminoácido original en la posición 27 (numeración de Kabat usada) se sustituye por F; G; R; S; 2 de F, G, R, S; 3 de F, G, R, S; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;
- el residuo de aminoácido original en la posición 28 (numeración de Kabat usada) se sustituye por A; I; S; T; 2 de A, I, S, T; 3 de A, I, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;
- 50 - el residuo de aminoácido original en la posición 29 (numeración de Kabat usada) se sustituye por F; G; L; S; 2 de F, G, L, S; 3 de F, G, L, S; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;
- el residuo de aminoácido original en la posición 30 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; G; S; T; 2 de D, G, S, T; 3 de D, G, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;
- 55 - el residuo de aminoácido original en la posición 31 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; I; N; S; T; 2 de D, I, N, S, T; 3 de D, I, N, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;
- 60 - el residuo de aminoácido original en la posición 32 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; N; Y; 2 de D, N, Y; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;
- el residuo de aminoácido original en la posición 33 (numeración de Kabat usada) se sustituye por A; G; T; V; 2 de A, G, T, V; 3 de A, G, T, V; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;
- 65 - el residuo de aminoácido original en la posición 34 (numeración de Kabat usada) se sustituye por I; M; o todos

ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 35 (numeración de Kabat usada) se sustituye por A; G; S; 2 de A, G, S; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

5 y las posiciones 50 a 58 si la secuencia de aminoácidos original tiene una secuencia de aminoácidos en la posición 52a (numeración de Kabat usada),

10 - el residuo de aminoácido original en la posición 50 (numeración de Kabat usada) se sustituye por A; C; G; S; T; 2 de A, C, G, S, T; 3 de A, C, G, S, T; 4 de A, C, G, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 51 (numeración de Kabat usada) se sustituye por I;

15 - el residuo de aminoácido original en la posición 52 (numeración de Kabat usada) se sustituye por N; R; S; T; 2 de N, R, S, T; 3 de N, R, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 52a (numeración de Kabat usada) se sustituye por R; S; T; W; 2 de R, S, T, W; 3 de R, S, T, W; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

20 - el residuo de aminoácido original en la posición 53 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; G; N; S; T; 2 de D, G, N, S, T; 3 de D, G, N, S, T; 4 de D, G, N, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 54 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; G; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

25 - el residuo de aminoácido original en la posición 55 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; G; S; 2 de D, G, S; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

30 - el residuo de aminoácido original en la posición 56 (numeración de Kabat usada) se sustituye por I; N; R; S; T; 2 de I, N, R, S, T; 3 de I, N, R, S, T; 4 de I, N, R, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 57 (numeración de Kabat usada) se sustituye por T;

35 - el residuo de aminoácido original en la posición 58 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; H; N; S; Y; 2 de D, H, N, S, Y; 3 de D, H, N, S, Y; 4 de D, H, N, S, Y; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

y en las que para las posiciones 50 a 58 si la secuencia de aminoácidos original no tiene una secuencia de aminoácidos en la posición 52a (numeración de Kabat usada),

40 - el residuo de aminoácido original en la posición 50 (numeración de Kabat usada) se sustituye por A; G; R; S; T; 2 de A, G, R, S, T; 3 de A, G, R, S, T; 4 de A, G, R, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 51 (numeración de Kabat usada) se sustituye por I;

45 - el residuo de aminoácido original en la posición 52 (numeración de Kabat usada) se sustituye por N; S; T; 2 de N, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 53 (numeración de Kabat usada) se sustituye por N; R; S; T; Y; 2 de N, R, S, T, Y; 3 de N, R, S, T, Y; 4 de N, R, S, T, Y; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

50 - el residuo de aminoácido original en la posición 54 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; G; R; S; 2 de D, G, R, S; 3 de D, G, R, S; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 55 (numeración de Kabat usada) se sustituye por G;

55 - el residuo de aminoácido original en la posición 56 (numeración de Kabat usada) se sustituye por G; N; R; S; T; 2 de D, N, R, S, T; 3 de D, N, R, S, T; 4 de D, N, R, S, T; o todos ellos, preferiblemente todos ellos;

- el residuo de aminoácido original en la posición 57 (numeración de Kabat usada) se sustituye por T;

60 - el residuo de aminoácido original en la posición 58 (numeración de Kabat usada) se sustituye por D; N; T; Y; 2 de D, N, T, Y; 3 de D, N, T, Y; o todos ellos, preferiblemente todos ellos,

65 tras lo cual una o más de las sustituciones potencialmente útiles (o combinaciones de las mismas) así determinadas pueden introducirse en dicha secuencia de CDR (de cualquiera manera conocida *per se*, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) y la(s) secuencia(s) de aminoácidos resultante(s) puede(n) someterse a

prueba para determinar su afinidad por la proteína F de VRSh, y/u otras propiedades deseadas tales como por ejemplo características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de Cl_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), afinidad mejorada y/o avidez mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh. De este modo, por medio de un grado limitado de ensayo y error, el experto en la técnica puede determinar otras sustituciones adecuadas en las CDR (o combinaciones adecuadas de las mismas) basándose en la divulgación en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos que comprenden un tramo de residuos de aminoácido que tiene una, dos o como máximo tres sustituciones, inserciones o deleciones, y secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas, pueden proporcionarse de cualquier manera conocida *per se*, por ejemplo usando una o más de las técnicas mencionadas en las páginas 103 y 104 del documento WO 08/020079.

Las secuencias de aminoácidos resultantes de la invención deben unirse preferiblemente a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de Cl_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento; y/o neutralizar VRSh con una eficacia y/o potencia que es tal como se define en el presente documento.

aa) Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término “diferencia de aminoácido” se refiere a una inserción, deleción o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia de aminoácidos, en comparación con la segunda secuencia de aminoácidos; entendiéndose que las dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o como máximo tres de tales diferencias de aminoácido. La “diferencia de aminoácido” puede ser una cualquiera, dos cualesquiera o como máximo cualquiera de tres sustituciones, deleciones o inserciones en la secuencia de aminoácidos, es decir en una o más de las regiones de armazón o en una o más de las CDR (que puede ser en una CDR de la invención (es decir, en CDR2) o en otra CDR (es decir, en CDR1, CDR2 o CDR3)), o cualquier combinación de las mismas, que o bien mejoran las propiedades de la secuencia de aminoácidos de la invención o que al menos no reducen mucho las propiedades deseadas o el equilibrio o la combinación de propiedades deseadas de la secuencia de aminoácidos de la invención. En este sentido, la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe unirse al menos a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones o inserciones, midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial; y/o la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe tener al menos una potencia que es igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones y/o inserciones. El experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones, deleciones o inserciones adecuadas, o combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones, deleciones o inserciones y determinar su influencia sobre las propiedades de la secuencia de aminoácidos así obtenidas.

En un aspecto de la invención, la “diferencia de aminoácido” es una sustitución de aminoácido. La sustitución de aminoácido puede ser una cualquiera, dos o como máximo tres sustituciones en una o más de las regiones de armazón o en una o más de las CDR (que pueden ser en una CDR de la invención (es decir, en CDR2) o en otra CDR (es decir, en CDR1, CDR2 o CDR3)), o cualquier combinación de las mismas, que o bien mejoran las propiedades de la secuencia de aminoácidos de la invención o que al menos no reducen mucho las propiedades deseadas o el equilibrio o la combinación de propiedades deseadas de la secuencia de aminoácidos de la invención. En este sentido, la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe unirse al menos a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial; y/o la secuencia de aminoácidos resultante de la invención debe al menos tener una potencia que es igual, aproximadamente igual o superior en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la una, dos o como máximo tres sustituciones. El experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones adecuadas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones y determinar su influencia sobre las propiedades de las secuencias de aminoácidos así obtenidas.

Tal como se indicó anteriormente, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ser en una o más de las regiones de armazón y/o en una o más de las CDR. Tal como se comentó anteriormente (véase el punto z anterior), la sustitución de aminoácido en una o más de las CDR puede ser cualquier sustitución tal como una “sustitución conservativa” (tal como se define en el presente documento), puede estar impulsada por determinadas reglas (tal como se define en el presente documento), y/o puede inducir propiedades mejoradas en las secuencias de aminoácidos resultantes. Cuando tales sustituciones, inserciones o deleciones se realizan en una o más de las regiones de armazón, pueden realizarse en uno o más de los residuos distintivos (tal como se define por ejemplo en el documento WO 08/020079; tablas A-3 a A-8) y/o en una o más de las otras posiciones en los residuos de armazón, aunque las sustituciones, inserciones o deleciones en los residuos distintivos son generalmente menos preferidas (a menos que éstas sean sustituciones de humanización adecuadas tal como se describe en el presente documento). Por medio de ejemplos no limitativos, una sustitución puede ser por ejemplo una sustitución

conservativa (tal como se describe en el presente documento) y/o un residuo de aminoácido puede reemplazarse por otro residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la misma posición en otro dominio de V_{HH} (véase el documento WO 08/020079, tablas A-5 a A-8), aunque la invención no se limita generalmente a ello.

5 Las sustituciones, inserciones o deleciones realizadas (preferiblemente) en una o más de las regiones de armazón pueden ser una sustitución de humanización (es decir, que reemplaza uno o más residuos de aminoácido en la
 10 secuencia de aminoácidos de una secuencia de V_{HH} que se produce de manera natural (y en particular en las secuencias de armazón) por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio de V_H de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano). Algunas
 15 sustituciones de humanización preferidas, pero no limitativas (y combinaciones adecuadas de las mismas) quedarán claras para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Pueden establecerse sustituciones de humanización potencialmente útiles comparando la secuencia de las regiones de armazón de una de la secuencia de aminoácidos de la invención definida en a) con la secuencia de armazón correspondiente de una o más
 20 secuencias de V_H humanas estrechamente relacionadas, tras lo cual una o más de las sustituciones de humanización potencialmente útiles (o combinaciones de las mismas) así determinadas pueden introducirse en dicha secuencia de aminoácidos de la invención definida en a) (de cualquier manera conocida *per se*, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) y la secuencia de aminoácidos humanizada resultante puede someterse a prueba para determinar su afinidad por la proteína F de VRSh, para determinar la estabilidad, la facilidad y el nivel de expresión, y/u otras propiedades deseadas definidas en el presente documento. De este modo,
 25 por medio de un grado limitado de ensayo y error, el experto puede determinar otras sustituciones de humanización adecuadas (o combinaciones adecuadas de las mismas) basándose en la divulgación en el presente documento.

Las sustituciones de humanización deben elegirse de manera que la secuencia de aminoácidos humanizada resultante y/o Nanobody[®] conserva todavía las propiedades favorables de Nanobodies[®] tal como se define en el
 25 presente documento. Un experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones de humanización adecuadas o combinaciones de sustituciones de humanización adecuadas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones de humanización y determinar su influencia sobre las propiedades de los Nanobodies[®] así obtenidos.

30 Generalmente, como resultado de la humanización, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención puede convertirse en un tipo más "humano", al tiempo que todavía conserva las propiedades favorables de los Nanobodies[®] de la invención tal como se describe en el presente documento. Como resultado, tal secuencia de aminoácidos humanizada y/o Nanobody[®] puede tener varias ventajas, tales como una inmunogenicidad reducida, en
 35 comparación con el dominio de V_{HH} que se produce de manera natural correspondiente. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, el experto será capaz de seleccionar sustituciones de humanización o combinaciones de sustituciones de humanización adecuadas que optimizan o logran un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones de humanización por un lado y las propiedades favorables de dominios de V_{HH}
 40 que se producen de manera natural por otro lado.

Las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención pueden humanizarse adecuadamente en cualquier residuo de armazón, tal como en uno o más residuos distintivos (tal como se define en el presente documento) o en uno o más de otros residuos de armazón (es decir, residuos no distintivos) o cualquier combinación adecuada de los
 45 mismos. Una sustitución de humanización preferida para los Nanobodies[®] del "grupo P,R,S-103" o el "grupo KERE" (tal como se define en el documento WO 08/020079) es Q108 a L108.

Dependiendo del organismo usado para expresar la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, tales deleciones y/o sustituciones también pueden diseñarse de un modo tal que se eliminan uno o más
 50 sitios de modificación postraducciona (tal como uno o más sitios de glucosilación), tal como estará dentro de la capacidad del experto en la técnica. Alternativamente, pueden diseñarse sustituciones o inserciones para introducir uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (tal como se describe en el presente documento), por ejemplo para permitir una pegilación específica de sitio (de nuevo tal como se describe en el presente documento).

55 Tal como puede observarse a partir de los datos sobre la entropía de V_{HH} y variabilidad de V_{HH} facilitados en las tablas A-5 - A-8 del documento WO 08/020079, algunos residuos de aminoácido en las regiones de armazón están más conservados que otros. Generalmente, aunque la invención en su sentido más amplio no se limita a las mismas, cualquier sustitución, deleción o inserción se realiza preferiblemente en las posiciones que están menos conservadas. Además, generalmente, se prefieren sustituciones de aminoácido con respecto a deleciones o
 60 inserciones de aminoácido. Cualquier sustitución de aminoácido aplicada a los polipéptidos descritos en el presente documento puede basarse también en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácido entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrolladas por Schulz *et al.*, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, sobre los análisis de potenciales de formación de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, y sobre los análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollados por Eisenberg *et al.*, Proc. Natl. 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 el presente
 65

documento en su totalidad como referencia. La información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de Nanobodies[®] se facilita en la descripción en el presente documento y en los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente. Además, para este fin, la estructura cristalina de un dominio de V_{HH} de una llama se facilita por ejemplo por 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). Puede encontrarse información adicional sobre algunos de los residuos de aminoácido que en dominios de V_H convencionales forman la superficie de contacto V_H/V_L y sustituciones de camelización potenciales en estas posiciones en la técnica anterior mencionada anteriormente.

5 Las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con una, dos o como máximo tres sustituciones, inserciones o deleciones, y secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas, pueden proporcionarse de cualquier manera conocida *per se*, por ejemplo usando una o más de las técnicas mencionadas en las páginas 103 y 104 del documento WO 08/020079.

15 Las secuencias de aminoácidos resultantes y/o Nanobodies[®] de la invención deben unirse preferiblemente a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso}, y/o velocidad de k_{dis.}, o alternativamente como valor de CI₅₀, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento; y/o neutralizar VRSh con una eficacia y/o potencia que es tal como se define en el presente documento.

20 bb) Cuando se comparan dos polipéptidos, el término “diferencia de aminoácido” se refiere a una inserción, deleción o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición del primer polipéptido, en comparación con el segundo polipéptido; entendiéndose que dos polipéptidos pueden contener una, dos o como máximo tres de tales diferencias de aminoácido.

25 La “diferencia de aminoácido” puede ser una cualquiera, dos cualesquiera o como máximo tres sustituciones, deleciones o inserciones en el polipéptido, es decir en una o más de las regiones de armazón o en una o más de las CDR (que puede ser en una CDR de la invención (es decir, en CDR2) o en otra CDR (es decir, en CDR1, CDR2 o CDR3)), o cualquier combinación de las mismas, que o bien mejoran las propiedades del polipéptido de la invención o que al menos no reducen mucho las propiedades deseadas o el equilibrio o la combinación de propiedades deseadas del polipéptido de la invención. En este sentido, el polipéptido resultante de la invención debe unirse al menos a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior en comparación con el polipéptido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones o inserciones, midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial; y/o el polipéptido resultante de la invención debe al menos tener una potencia que es igual, aproximadamente igual o superior en comparación con el polipéptido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones y/o inserciones. El polipéptido resultante debe unirse preferiblemente a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso}, y/o velocidad de k_{dis.}, o alternativamente como valor de CI₅₀, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento; y/o neutralizar VRSh con una eficacia y/o potencia que es tal como se define en el presente documento. El experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones, deleciones o inserciones adecuadas, o combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones, deleciones o inserciones y determinar su influencia sobre las propiedades del polipéptido así obtenido.

50 En un aspecto de la invención, la “diferencia de aminoácido” es una sustitución de aminoácido. La sustitución de aminoácido puede ser una cualquiera, dos cualesquiera o como máximo tres cualesquiera sustituciones en las regiones de armazón o en una o más de las CDR (que puede ser en una CDR de la invención (es decir, presente en CDR2) o en otra CDR (es decir, en CDR1, CDR2 o CDR3)), o cualquier combinación de las mismas, que o bien mejoran las propiedades del polipéptido de la invención o que al menos no reducen mucho las propiedades deseadas o el equilibrio o la combinación de propiedades deseadas del polipéptido de la invención. En este sentido, el polipéptido resultante de la invención debe unirse al menos a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior en comparación con el polipéptido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones o inserciones, midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial; y/o el polipéptido resultante de la invención debe al menos tener una potencia que es igual, aproximadamente igual o superior en comparación con el polipéptido sin la una, dos o como máximo tres sustituciones, deleciones y/o inserciones. El polipéptido resultante debe unirse preferiblemente a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso}, y/o velocidad de k_{dis.}, o alternativamente como valor de CI₅₀, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento; y/o neutralizar VRSh con una eficacia y/o potencia que es tal como se define en el presente documento. El experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones adecuadas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones y determinar su influencia sobre las propiedades de polipéptidos así obtenidos.

Tal como se indicó anteriormente, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ser en una o más de las regiones de armazón y/o en una o más de las CDR. Tal como se comentó anteriormente (véase el punto z)), las sustituciones, inserciones o deleciones en las CDR pueden ser cualquier sustitución, inserción o deleción posible tal como “sustitución conservativa” (tal como se define en el presente documento), puede estar impulsada por determinadas reglas (tal como se define en el presente documento), y/o puede inducir propiedades mejoradas en los polipéptidos resultantes.

Cuando tales sustituciones, inserciones o deleciones se realizan en una o más de las regiones de armazón, pueden realizarse en uno o más de los residuos distintivos (tal como se define por ejemplo en el documento WO 08/020079; tablas A-3 a A-8) y/o en una o más de las otras posiciones en los residuos de armazón, aunque las sustituciones, inserciones o deleciones en los residuos distintivos generalmente se prefieren menos (a menos que éstas sean sustituciones de humanización adecuadas tal como se describe en el presente documento). Por medio de ejemplos no limitativos, una sustitución puede ser por ejemplo una sustitución conservativa (tal como se describe en el presente documento) y/o puede reemplazarse un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la misma posición en otro dominio de V_{HH} (véase el documento WO 08/020079, tablas A-5 a A-8), aunque la invención no se limita generalmente a ello.

Las sustituciones, inserciones o deleciones realizadas (preferiblemente) en una o más de las regiones de armazón pueden ser una sustitución de humanización. Algunas sustituciones de humanización preferidas pero no limitativas (y combinaciones adecuadas de las mismas) quedarán claras para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Pueden establecerse sustituciones de humanización potencialmente útiles comparando la secuencia de las regiones de armazón de una de las secuencias de aminoácidos abarcadas en el polipéptido de la invención definido en a) con la secuencia de armazón correspondiente de una o más secuencias de V_H humanas estrechamente relacionadas, tras lo cual una o más de las sustituciones de humanización potencialmente útiles (o combinaciones de las mismas) así determinadas pueden introducirse en dicho polipéptido de la invención definido en a) (de cualquier manera conocida *per se*, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) y la secuencia de polipéptido resultante puede someterse a prueba para determinar la afinidad por la proteína F de VRSh, para determinar la estabilidad, la facilidad y el nivel de expresión, y/u otras propiedades deseadas definidas en el presente documento. De este modo, por medio de un grado limitado de ensayo y error, el experto puede determinar otras sustituciones de humanización adecuadas (o combinaciones adecuadas de las mismas) basándose en la divulgación en el presente documento.

Las sustituciones de humanización deben elegirse de manera que las secuencias de polipéptido humanizadas resultantes todavía conserven las propiedades favorables de Nanobodies[®] abarcados en el polipéptido tal como se define en el presente documento. Un experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones de humanización adecuadas o combinaciones de sustituciones de humanización adecuadas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede implicar por ejemplo introducir un número limitado de posibles sustituciones de humanización y determinar su influencia sobre las propiedades de los Nanobodies[®] abarcados en el polipéptido así obtenido.

Generalmente, como resultado de la humanización, el polipéptido de la invención puede convertirse en un tipo más “humano”, al tiempo que todavía conserva las propiedades favorables de los Nanobodies[®] de la invención tal como se describe en el presente documento. Como resultado, tales polipéptidos humanizados pueden tener varias ventajas, tales como una inmunogenicidad reducida, en comparación con los polipéptidos que abarcan los dominios de V_{HH} que se producen de manera natural correspondiente. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, el experto será capaz de seleccionar sustituciones de humanización o combinaciones de sustituciones de humanización adecuadas que optimizan o logran un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones de humanización por un lado y las propiedades favorables de dominios de V_{HH} que se producen de manera natural por otro lado.

Los polipéptidos de la invención pueden humanizarse adecuadamente en cualquier residuo de armazón, tal como en uno o más residuos distintivos (tal como se define en el presente documento) o en uno o más de otros residuos de armazón (es decir, residuos no distintivos) o cualquier combinación adecuada de los mismos. Una sustitución de humanización preferida para los Nanobodies[®] del “grupo P,R,S-103” o el “grupo KERE” es Q108 a L108.

Dependiendo del organismo usado para expresar los polipéptidos de la invención, tales deleciones y/o sustituciones también pueden diseñarse de un modo tal que se eliminan uno o más sitios de modificación postraduccional (tal como uno o más sitios de glucosilación), tal como estará dentro de la capacidad del experto en la técnica. Alternativamente, pueden diseñarse sustituciones o inserciones para introducir uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (tal como se describe en el presente documento), por ejemplo para permitir una pegilación específica de sitio (de nuevo tal como se describe en el presente documento).

Tal como puede observarse a partir de los datos sobre la entropía de V_{HH} y variabilidad de V_{HH} facilitados en las tablas A-5 - A-8 del documento WO 08/020079, algunos residuos de aminoácido en las regiones de armazón están más conservados que otros. Generalmente, aunque la invención en su sentido más amplio no se limita a las

5 mismas, cualquier sustitución, delección o inserción se realiza preferiblemente en las posiciones que están menos conservadas. Además, generalmente, se prefieren sustituciones de aminoácido con respecto a delecciones o inserciones de aminoácido. Cualquier sustitución de aminoácido aplicada a los polipéptidos descritos en el presente documento puede basarse también en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácido entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrolladas por Schulz *et al.*, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, sobre los análisis de potenciales de formación de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, y sobre los análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollados por Eisenberg *et al.*, Proc. Natl. 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 el presente documento en su totalidad como referencia. La información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de Nanobodies[®] se facilita en la descripción en el presente documento y en los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente. Además, para este fin, la estructura cristalina de un dominio de V_{HH} de una llama se facilita por ejemplo por 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). Puede encontrarse información adicional sobre algunos de los residuos de aminoácido que en dominios de V_H convencionales forman la superficie de contacto V_H/V_L y sustituciones de camelización potenciales en estas posiciones en la técnica anterior mencionada anteriormente.

20 Los polipéptidos con una, dos o como máximo tres sustituciones, inserciones o delecciones, y secuencias de ácido nucleico que codifican los mismos, pueden proporcionarse de cualquier manera conocida *per se*, por ejemplo usando una o más de las técnicas mencionadas en las páginas 103 y 104 del documento WO 08/020079.

25 Los polipéptidos resultantes de la invención deben unirse preferiblemente a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso}, y/o velocidad de k_{dis}, o alternativamente como valor de CI₅₀, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento; y/o neutralizar VRSh con una eficacia y/o potencia que es tal como se define en el presente documento.

30 cc) Las figuras, lista de secuencias y la parte experimental/ejemplos se facilitan sólo para ilustrar adicionalmente la invención y no deben interpretarse o considerarse como limitativos del alcance de la invención y/o de las reivindicaciones adjuntas de ningún modo, a menos que se indique explícitamente de otro modo en el presente documento.

35 Para la unión a su epítipo en la proteína F de VRSh, una secuencia de aminoácidos contendrá habitualmente dentro de su secuencia de aminoácidos uno o más residuos de aminoácido o uno o más tramos de residuos de aminoácido (tal como se define en el presente documento; es decir, comprendiendo cada "tramo" dos o más residuos de aminoácido que son adyacentes entre sí o están en proximidad estrecha entre sí, es decir en la estructura primaria o terciaria de la secuencia de aminoácidos) por medio de los cuales la secuencia de aminoácidos de la invención puede unirse a su epítipo en la proteína F de VRSh. Estos residuos de aminoácido o tramos de residuos de aminoácido forman por tanto el "sitio" para la unión al epítipo en la proteína F de VRSh (también denominado en el presente documento "sitio de unión a antígeno"; tal como se define adicionalmente en el presente documento).

45 La presente invención proporciona varios tramos de residuos de aminoácido (tal como se define en el presente documento) que son particularmente adecuados para unirse al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh (para una descripción de sitios antigénicos en la proteína F de VRSh se hace referencia a Lopez *et al.* 1998, J. Virol. 72: 6922-6928). Estos tramos de residuos de aminoácido pueden estar presentes en, y/o pueden incorporarse en, una secuencia de aminoácidos de la invención, en particular de un modo tal que forman (parte de) el sitio de unión a antígeno de la secuencia de aminoácidos de la invención. Las secuencias de aminoácidos resultantes se unirán a un epítipo específico en la proteína F de VRSh que se encuentra en, forma parte de o se solapa con (es decir, en la estructura primaria o terciaria) o está en proximidad estrecha de (es decir, en la estructura primaria o terciaria) el sitio antigénico II en la proteína F de VRSh. Además, las secuencias de aminoácidos resultantes de la invención serán preferiblemente tales que pueden competir con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh; y/o tales que pueden unirse al mismo epítipo o sitio de unión en la proteína F de VRSh que Synagis[®], o a un epítipo próximo a dicho sitio de unión y/o que se solapa con dicho sitio de unión.

55 La presente invención proporciona un tramo de residuos de aminoácido (SEQ ID NO: 102) que es particularmente adecuado para la unión a la proteína F de VRSh. Este tramo de residuos de aminoácido (o variantes de SEQ ID NO: 102 tal como se define en el presente documento) puede estar presente en, y/o puede incorporarse en, una secuencia de aminoácidos de la invención, en particular de un modo tal que forman (parte de) el sitio de unión a antígeno de la secuencia de aminoácidos de la invención. El tramo de residuos de aminoácido se ha generado como secuencia de CDR2 de un anticuerpo de cadena pesada o secuencia de V_{HH} (NC41; SEQ ID NO: 5) que se generó contra la proteína F de VRSh y que se modificó adicionalmente en un enfoque de biblioteca para generar Nanobodies[®] NC41 humanizados (tal como se describe en la sección de ejemplos). Más en particular, el residuo de glicina (Gly, G) en la posición 6 de la CDR2 de NC41 se sustituyó por un residuo de ácido aspártico (Asp, D). Sorprendentemente, se han observado características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso}, y/o velocidad de k_{dis},

o alternativamente como valor de Cl_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), afinidad mejorada y/o avidéz mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh, para secuencias de aminoácidos que comprenden este tramo de residuos de aminoácido (SEQ ID NO: 102). Este tramo de residuos de aminoácido (o variantes de SEQ ID NO: 102, tal como se define en el presente documento) se denomina también en el presente documento "secuencias de CDR2 de la invención".

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

15 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 En un aspecto preferido, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos que comprenden dos o más tramos de residuos de aminoácido en los que un tramo se elige de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

30 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

35 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos un tramo se elige de:

45 c) SEQ ID NO: 98;

50 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

55 e) SEQ ID NO: 121; y

60 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

65 de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos de la invención y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se

elige de uno de c), d), e) y f).

Incluso más preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de la invención comprenden tres o más tramos de residuos de aminoácido, en los que el primer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

5 a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

15 el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

20 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

25 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y el tercer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

35 e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

45 Las secuencias de aminoácidos que comprenden uno o más de los tramos de residuos de aminoácido especificados anteriormente muestran propiedades mejoradas tales como por ejemplo características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), afinidad mejorada y/o aidez mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh.

Más en particular, las secuencias de aminoácidos de la invención que comprenden uno o más de los tramos de residuos de aminoácido especificados anteriormente pueden unirse a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) preferiblemente de manera que:

60 - se unen a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 15 nM a 1 nM o incluso de 10 nM a 1 nM o menos;

y/o de manera que:

65 - se unen a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ hasta aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más;

y/o de manera que:

- se unen a la proteína F de VRSh con una velocidad de $k_{dis.}$ de entre $10^{-2}s^{-1}$ ($t_{1/2}=0,69$ s) y $10^{-4}s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre $10^{-3}s^{-1}$ y $10^{-4}s^{-1}$, o inferior.

Algunos valores de CI_{50} preferidos para la unión de las secuencias de aminoácidos de la invención a la proteína F de VRSh quedarán claros a partir de la descripción adicional y los ejemplos en el presente documento.

Los ensayos para determinar la CI_{50} incluyen ensayos de competencia tales como ELISA de competencia (por ejemplo, competencia con Synagis® o su fragmento Fab) o más preferiblemente ensayos de neutralización tales como el ensayo de microneutralización descrito por Anderson *et al.* (1985, J. Clin. Microbiol. 22: 1050-1052; 1988, J. Virol. 62: 4232-4238), modificaciones de este ensayo tal como se describe por ejemplo en el ejemplo 6 o un ensayo de reducción de placa de lisis tal como se describe por ejemplo por Johnson *et al.* (1997, J. Inf. Dis. 176: 1215-1224), y modificaciones de los mismos.

Por ejemplo, en un ensayo de competencia con el fragmento Fab de Synagis®, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden tener valores de CI_{50} de entre 1 nM y 100 nM, preferiblemente entre 10 nM y 50 nM, o menos.

Por ejemplo, en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe por ejemplo en el ejemplo 6) las secuencias de aminoácidos de la invención pueden tener valores de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente entre 100 nM y 500 nM, o menos.

Debe indicarse que la invención no está limitada en cuanto al origen de la secuencia de aminoácidos de la invención (o de la secuencia de nucleótidos de la invención usada para expresarla), ni en cuanto al modo en el que la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de la invención se genera o se obtiene (o se ha generado u obtenido). Por tanto, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden ser secuencias de aminoácidos que se producen de manera natural (a partir de cualquier especie adecuada) o secuencias de aminoácidos sintéticas o semisintéticas.

Debe indicarse que la invención en su sentido más amplio no se limita a una función o papel estructural específico que estos tramos de residuos de aminoácido pueden tener en la secuencia de aminoácidos de la invención, siempre que estos tramos de residuos de aminoácido permitan que la secuencia de aminoácidos de la invención se una al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh con una determinada afinidad y/o potencia (tal como se define en el presente documento). Por tanto, generalmente, la invención en su sentido más amplio comprende cualquier secuencia de aminoácidos que sea capaz de unirse al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y que comprende uno o más tramos de residuos de aminoácido tal como se define en el presente documento (y en particular una combinación adecuada de dos o más de tales tramos de residuos de aminoácido) que se unen adecuadamente entre sí por medio de una o más secuencias de aminoácidos adicionales, de manera que toda la secuencia de aminoácidos forma un dominio de unión y/o unidad de unión que es capaz de unirse al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh.

Una secuencia de aminoácidos de este tipo puede ser, por ejemplo, un "armazón proteico" adecuado que comprende al menos un tramo de residuos de aminoácido tal como se define en el presente documento (es decir, como parte de su sitio de unión a antígeno). Los armazones adecuados para presentar secuencias de aminoácidos quedarán claros para el experto, y por ejemplo comprenden, sin limitación, armazones de unión basados en o derivados de inmunoglobulinas, armazones proteicos derivados de dominios de proteína A (tales como Affibodies™), tendamistat, fibronectina, lipocalina, CTLA-4, receptores de linfocitos T, repeticiones de anquirina diseñadas, avímeros y dominios de PDZ (Binz *et al.* 2005, Nat. Biotech. 23: 1257), y restos de unión basados en ADN o ARN incluyendo pero sin limitarse a aptámeros de ADN o ARN (Ulrich *et al.* 2006, Comb. Chem. High Throughput Screen 9(8): 619-32).

De nuevo, cualquier secuencia de aminoácidos de la invención que comprende uno o más de los tramos de secuencias de aminoácidos tal como se define en el presente documento para las secuencias de aminoácidos de la invención es preferiblemente tal que puede unirse específicamente (tal como se define en el presente documento) a proteína F de VRSh, y más en particular de manera que puede unirse a proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), que es tal como se define en el presente documento. Cualquier secuencia de aminoácidos de la invención que comprende uno o más de los tramos de residuos de aminoácido tal como se define en el presente documento para las secuencias de aminoácidos de la invención es preferiblemente tal que puede neutralizar VRSh con una potencia (tal como se mide en un ensayo adecuado tal como se define en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento.

Además, también quedará claro para el experto que puede ser posible "injertar" una o más de las CDR definidas en el presente documento para las secuencias de aminoácidos de la invención sobre otros "armazones", incluyendo pero sin limitarse a armazones humanos o armazones distintos de inmunoglobulina. Los armazones y las técnicas

5 adecuadas para tal injerto de CDR quedarán claros para el experto y se conocen bien en la técnica, véanse por ejemplo los documentos US 7.180.370, WO 01/27160, EP 0 605 522, EP 0 460 167, US 7.054.297, Nicaise *et al.*, Protein Science (2004), 13:1882-1891; Ewert *et al.*, Methods, octubre de 2004; 34(2):184-199; Kettleborough *et al.*, Protein Eng., octubre de 1991; 4(7): 773-783; O'Brien y Jones, Methods Mol. Biol. 2003: 207: 81-200; y Skerra, J. Mol. Recognit. 2000: 13: 167-187, y Saerens *et al.*, J. Mol. Biol. 23 de septiembre de 2005; 352(3):597-607, y las referencias adicionales citadas en los mismos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas conocidas *per se* para injertar CDR de ratón o rata sobre armazones o entramados humanos de una manera análoga para proporcionar proteínas químicas que comprenden una o más de las secuencias de CDR definidas en el presente documento para las secuencias de aminoácidos de la invención y una o más secuencias o regiones de armazón humanas.

10 En un aspecto específico, pero no limitativo, la secuencia de aminoácidos de la invención puede ser una secuencia de aminoácidos que comprende un pliegue de inmunoglobulina o una secuencia de aminoácidos que, en condiciones adecuadas (tales como condiciones fisiológicas) es capaz de formar un pliegue de inmunoglobulina (es decir, mediante plegado). Se hace referencia entre otros a la revisión de Halaby *et al.* (1999, J. Protein Eng. 12: 563-71). Preferiblemente, cuando se pliegan apropiadamente para formar un pliegue de inmunoglobulina, los tramos de residuos de aminoácido pueden ser capaces de formar apropiadamente el sitio de unión a antígeno para la unión al sitio antigénico II específico en la proteína F de VRSh; y más preferiblemente capaces de unirse al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de Cl_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento.

25 En otro aspecto específico, pero no limitativo, las secuencias de aminoácidos de la invención son secuencias de inmunoglobulina. En particular, pero sin limitación, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden ser secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de una secuencia de aminoácidos de este tipo que se une todavía al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh.

30 En una secuencia de aminoácidos de este tipo de la invención, las secuencias de armazón pueden ser cualquier secuencia de armazón adecuada, y los ejemplos de secuencias de armazón adecuadas quedarán claros para el experto, por ejemplo basándose en los manuales convencionales y la divulgación adicional y la técnica anterior mencionada en el presente documento.

35 Las secuencias de armazón son preferiblemente (una combinación adecuada de) secuencias de armazón de inmunoglobulina o secuencias de armazón que se han derivado de secuencias de armazón de inmunoglobulina (por ejemplo, mediante humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias de armazón pueden ser secuencias de armazón derivadas de un dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de V_L) y/o de un dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de V_H). Cuando la secuencia de aminoácidos de la invención es una secuencia de dominio variable de cadena pesada, puede ser una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional (tal como, sin limitación, una secuencia de V_H que se deriva de un anticuerpo humano) o ser una denominada secuencia de V_{HH} (tal como se define en el presente documento) que se deriva de un denominado "anticuerpo de cadena pesada" (tal como se define en el presente documento). En un aspecto particularmente preferido, las secuencias de armazón son o bien secuencias de armazón que se han derivado de una secuencia de V_{HH} (en las que dichas secuencias de armazón opcionalmente pueden humanizarse parcial o completamente) o son secuencias de V_H convencionales que se han camelizado (tal como se define en el presente documento).

50 Para una descripción general de anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables de los mismos, se hace referencia entre otros a la técnica anterior mencionada en el presente documento, así como a la técnica anterior mencionada en la página 59 del documento WO 08/020079 y a la lista de referencias mencionadas en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153, técnica anterior y referencias que se incorporan en el presente documento como referencia.

55 Las secuencias de armazón pueden ser preferiblemente tales que la secuencia de aminoácidos de la invención es un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio); es un anticuerpo de un único dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de un único dominio); es un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb); o es un Nanobody[®] (incluyendo pero sin limitarse a la secuencia de V_{HH}). De nuevo, las secuencias de armazón adecuadas quedarán claras para el experto, por ejemplo basándose en los manuales convencionales y la divulgación adicional y técnica anterior mencionada en el presente documento.

60 En particular, las secuencias de armazón presentes en las secuencias de aminoácidos de la invención pueden contener uno o más de residuos distintivos (tal como se define en el documento WO 08/020079 (tablas A-3 a A-8)), de manera que la secuencia de aminoácidos de la invención es un Nanobody[®]. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de (combinaciones adecuadas de) tales secuencias de armazón quedarán claros a partir de la divulgación adicional en el presente documento (véase por ejemplo la tabla A-6). Generalmente, los Nanobodies[®]

(en particular secuencias de V_{HH} y Nanobodies[®] parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular mediante la presencia de uno o más “residuos distintivos” en una o más de las secuencias de armazón (tal como se describe adicionalmente por ejemplo en el documento WO 08/020079, página 61, línea 24 a la página 98, línea 3).

5 Tal como ya se describió en el presente documento, la secuencia de aminoácidos y la estructura de un Nanobody[®] puede considerarse, sin limitarse sin embargo a lo mismo, que está compuesta por cuatro regiones de armazón o “FR”, que se denominan en la técnica y en el presente documento “región de armazón 1” o “FR1”; “región de armazón 2” o “FR2”; “región de armazón 3” o “FR3”; y “región de armazón 4” o “FR4”, respectivamente; regiones de armazón que están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o “CDR”, que se denominan en la técnica “región determinante de complementariedad 1” o “CDR1”; “región determinante de complementariedad 2” o “CDR2”; y “región determinante de complementariedad 3” o “CDR3”, respectivamente. Algunas secuencias de armazón y CDR preferidas (y combinaciones de las mismas) que están presentes en los Nanobodies[®] de la invención son tal como se describe en el presente documento.

15 Por tanto, generalmente, un Nanobody[®] puede definirse como una secuencia de aminoácidos con la estructura (general)

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

20 en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones de armazón 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los residuos distintivos son tal como se define adicionalmente en el presente documento.

25 En este sentido, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden consistir esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que CDR2 se elige de:

a) SEQ ID NO: 102;

30 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

45 Estas regiones determinantes de complementariedad preferidas (secuencias de CDR2) se denominan también “las CDR2 de la invención”.

Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden consistir esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que CDR2 se elige del grupo que consiste en:

50 a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

55 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

65 y al menos una de CDR1 o CDR3 se elige de:

- CDR1 elegida del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 98;

5 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la
10 secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y/o

15 - CDR3 elegida del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

20 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene no más de 3; preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 diferencia de aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la
25 secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Incluso más preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden consistir esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que:

30 - CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

35 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la
40 secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido; o

y

45 - CDR2 se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

50 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

55 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en
60 comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

65 - CDR3 se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto específico, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende al menos SEQ ID NO: 102.

En otro aspecto específico, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98; siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

c) SEQ ID NO: 121;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende al menos SEQ ID NO: 102 y al menos dos tramos de residuos de aminoácido (secuencias de CDR) en los que un tramo se elige del grupo que consiste en los tramos de residuos de aminoácido definidos en a) y b) y en los que el otro tramo se elige del grupo que consiste en los tramos de residuos de aminoácido definidos en c) y d).

En otro aspecto específico, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

En la tabla A-6 se muestran también combinaciones preferidas de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3.

Las secuencias de aminoácidos de la invención pueden consistir esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o pueden consistir esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cadena pesada. Las secuencias de aminoácidos de la invención pueden consistir esencialmente en un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), en un anticuerpo de un único dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de un único dominio), en un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como un dAb) o en un Nanobody[®].

Para una descripción general de anticuerpos de (un único) dominio, se hace también referencia a la técnica anterior mencionada anteriormente, así como al documento EP 0 368 684. Para el término "dAb", se hace referencia por ejemplo a Ward *et al.* (1989, Nature 341: 544-6), a Holt *et al.*, 2003, Trends Biotechnol. 21: 484-490; así como a por ejemplo los documentos WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. Debe indicarse también que, aunque se prefiere menos en el contexto de la presente invención porque no son de origen de mamífero, los anticuerpos de un único dominio o dominios variables individuales pueden derivarse de determinadas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados "dominios de IgNAR", véase por ejemplo el documento WO 05/18629).

En particular, la secuencia de aminoácidos de la invención puede consistir esencialmente en o puede ser un Nanobody[®] (tal como se define en el presente documento) o un fragmento adecuado del mismo. [Nota: Nanobody[®], Nanobodies[®] y Nanoclone[®] son marcas comerciales registradas de Ablynx N.V.]

5 Un Nanobody[®] puede definirse como una secuencia de aminoácidos con la estructura (general)
FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

10 en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones de armazón 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los residuos distintivos son tal como se define en el documento WO 08/020079 (tablas A-3 a A-8).

15 Más en particular, un Nanobody[®] puede ser una secuencia de aminoácidos con la estructura (general)
FR1- CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

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

i) tienen una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 (véase la tabla A-4), en la que para los fines de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR no se tienen en cuenta. En este sentido, se hace también referencia a la tabla A-6, que enumera las secuencias de armazón 1 (SEQ ID NO: 81-97 y 166), secuencias de armazón 2 (SEQ ID NO: 99-100), secuencias de armazón 3 (SEQ ID NO: 103-120 y 167-168) y secuencias de armazón 4 (SEQ ID NO: 123 y 169) de los Nanobodies[®] de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 (véase la tabla A-4);

25 y en la que:

30 ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla A-3 a la tabla A-8 del documento WO 08/020079.

35 Para una descripción general adicional de Nanobodies[®], se hace referencia a la técnica anterior mencionada en el presente documento, tal como se describe por ejemplo en el documento WO 08/020079 (página 16).

40 Tales Nanobodies[®] pueden derivarse de cualquier manera adecuada y de cualquier fuente adecuada, y pueden ser por ejemplo secuencias de V_{HH} que se producen de manera natural (es decir, de una especie adecuada de camélido) o secuencias de aminoácidos sintéticas o semisintéticas.

45 De nuevo, tales Nanobodies[®] pueden derivarse de cualquier manera adecuada y de cualquier fuente adecuada, y pueden ser por ejemplo secuencias de V_{HH} que se producen de manera natural (es decir, de una especie adecuada de camélido) o secuencias de aminoácidos sintéticas o semisintéticas, incluyendo pero sin limitarse a Nanobodies[®] "humanizados" (tal como se define en el presente documento), secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (tal como se define en el presente documento) (y en particular secuencias de dominio variable de cadena pesada camelizadas), así como Nanobodies[®] que se han obtenido mediante técnicas tales como maduración por afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, al azar o que se producen de manera natural), injerto de CDR, remodelación de la superficie, fragmentos de combinación derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR usando cebadores solapantes, y técnicas similares para genomodificar secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por el experto; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las anteriores tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Además, cuando un Nanobody[®] comprende una secuencia de V_{HH}, dicho Nanobody[®] puede estar adecuadamente humanizado, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, para proporcionar uno o más Nanobodies[®] humanizados (parcial o completamente) adicionales de la invención. De manera similar, cuando un Nanobody[®] comprende una secuencia sintética o semisintética (tal como una secuencia parcialmente humanizada), dicho Nanobody[®] puede opcionalmente humanizarse adecuadamente de manera adicional, de nuevo tal como se describe en el presente documento, de nuevo para proporcionar uno o más Nanobodies[®] humanizados (parcial o completamente) adicionales de la invención.

60 En particular, los Nanobodies[®] humanizados pueden ser secuencias de aminoácidos que se definen generalmente para Nanobodies[®] en los párrafos previos, pero en las que está presente al menos un residuo de aminoácido (y en particular, en al menos uno de los residuos de armazón) que es y/o que corresponde a una sustitución de humanización (tal como se define en el presente documento). Algunas sustituciones de humanización preferidas, pero no limitativas (y combinaciones adecuadas de las mismas) quedarán claras para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Además, o alternativamente, pueden establecerse otras sustituciones de

humanización potencialmente útiles comparando la secuencia de las regiones de armazón de una secuencia de V_{HH} que se produce de manera natural con la secuencia de armazón correspondiente de una o más secuencias de V_H humanas estrechamente relacionadas, tras lo cual una o más de las sustituciones de humanización (o combinaciones de las mismas) potencialmente útiles así determinadas puede introducirse en dicha secuencia de V_{HH} (de cualquier manera conocida *per se*, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) y las secuencias de V_{HH} humanizadas resultantes pueden someterse a prueba para determinar su afinidad por la diana, su estabilidad, su facilidad y nivel de expresión, y/o para determinar otras propiedades deseadas. De este modo, por medio de un grado limitado de ensayo y error, el experto puede determinar otras sustituciones de humanización adecuadas (o combinaciones adecuadas de las mismas) basándose en la divulgación en el presente documento. Además, basándose en lo anterior, (las regiones de armazón de) un Nanobody[®] pueden humanizarse parcialmente o humanizarse completamente.

En este sentido, algunos Nanobodies[®] preferidos de la invención son Nanobodies[®] que se unen específicamente (tal como se define adicionalmente en el presente documento) a la proteína F de VRSh y que:

i) son una variante humanizada de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 (véase la tabla A-1); y/o

ii) tienen una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (véase la tabla A-1) y/o al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 (véase la tabla A-4), en los que para los fines de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR no se tienen en cuenta;

y en los que:

iii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla A-3 a la tabla A-8 del documento WO 08/020079.

La presente invención proporciona varias secuencias de aminoácidos humanizadas y/o de secuencia optimizada y/o Nanobodies[®] que son particularmente adecuados para la unión a proteína F de VRSh. Por tanto, en un aspecto de la presente invención, se proporcionan secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76.

La presente invención también proporciona varias secuencias de aminoácidos humanizadas y/o de secuencia optimizada y/o Nanobodies[®] que se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

Las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la presente invención muestran inmunogenicidad reducida tras la administración a un sujeto humano. Además, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la presente invención muestran características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de K_{aso} , y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) por proteína F de VRSh en comparación con sus secuencias de aminoácidos originales correspondientes (tal como se describe en el documento WO 2009/147248).

Durante la producción de los Nanobodies de la invención, se detectó un alto nivel de piroglutamato (pGlu) en el extremo amino-terminal mediante RP-HPLC. Se detectaron niveles de más del 15% de pGlu tras la fermentación y el nivel de pGlu aumentó regularmente tras el almacenamiento durante estudios de estabilidad. Una modificación de este tipo conduce a heterogeneidad del producto final y es necesario evitarla. El control/prevenición de la formación de pGlu es por tanto crítico para mantener proteínas terapéuticas dentro de sus especificaciones fijadas. Se necesitan condiciones de almacenamiento y/o formulaciones líquidas específicas para proteínas con un ácido glutámico N-terminal minimizando así la formación de ácido piro-glutámico.

En la presente invención, se eliminó la posibilidad de modificación postraduccional de pGlu del extremo N-terminal cambiando el ácido glutámico N-terminal (E) $[HOOC-(CH_2)_2\text{-proteína}]$ a un ácido aspártico (D) $[HOOC-CH_2\text{-proteína}]$ que conduce a estabilidad de producto aumentada. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a secuencias de aminoácidos y Nanobodies tal como se describió anteriormente en los que el ácido glutámico en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat) se cambia a un ácido aspártico.

La presente invención proporciona varias secuencias de aminoácidos de secuencia optimizada y/o Nanobodies[®] que muestran estabilidad aumentada tras almacenamiento durante estudios de estabilidad. Por tanto, en un aspecto de la presente invención, se proporcionan secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.

En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.

En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.

En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.

En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153, en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 138. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 139. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 140. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 141. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 154-157.

- 5 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.
- 10 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.
- 15 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.
- 20 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.
- 25 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.
- 30 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.
- 35 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.
- 40 En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que la posición 1 (Glu) se ha cambiado a Asp.
- 45 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que los siguientes residuos de aminoácido se han mutado:
- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
 - Gly54Asp;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 5 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- Glu1Asp;
- 10 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 15 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 20 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- Glu1Asp y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- 25 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 30 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- 35 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.
- 40 Las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la presente invención muestran propiedades mejoradas tales como por ejemplo estabilidad mejorada, menos inmunogenicidad, características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} . y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), afinidad mejorada y/o aidez mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia
- 45 mejoradas para neutralizar VRSh en comparación con sus secuencias de aminoácidos de tipo natural correspondientes (tal como se describe en el documento WO 2009/147248).
- Más en particular, las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención pueden unirse a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} . y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe
- 50 adicionalmente en el presente documento) preferiblemente de manera que:
 - se unen a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 15 nM a 1 nM o incluso de 10 nM a 1 nM o menos;
 - 55 y/o de manera que:
 - se unen a la proteína F de VRSh con velocidad de k_{aso} . de entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ a aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o más;
 - 60 y/o de manera que:
 - se unen a la proteína F de VRSh con una velocidad de $k_{dis.}$ de entre $10^{-2} s^{-1}$ ($t_{1/2}=0,69 s$) y $10^{-4} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-4} s^{-1}$, o inferior.
 - 65

Algunos valores de CI_{50} preferidos para la unión de las secuencias de aminoácidos de la invención a proteína F de VRSh quedarán claros a partir de la descripción adicional y ejemplos en el presente documento.

Los ensayos para determinar la CI_{50} incluyen ensayos de competencia tales como ELISA de competencia (por ejemplo, competencia con Synagis[®] o su fragmento Fab) o más preferiblemente ensayos de neutralización tales como el ensayo de microneutralización descrito por Anderson *et al.* (1985, J. Clin. Microbiol. 22: 1050-1052; 1988, J. Virol. 62: 4232-4238), modificaciones de este ensayo tal como se describe por ejemplo en el ejemplo 6 o un ensayo de reducción de placas de lisis tal como se describe por ejemplo por Johnson *et al.* (1997, J. Inf. Dis. 176:1215-1224), y modificaciones de los mismos.

Por ejemplo, en un ensayo de competencia con el fragmento Fab de Synagis[®], las secuencias de aminoácidos de la invención pueden tener valores de CI_{50} de entre 1 nM y 100 nM, preferiblemente entre 10 nM y 50 nM, o menos.

Por ejemplo, en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe por ejemplo en el ejemplo 6) las secuencias de aminoácidos de la invención pueden tener valores de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente de entre 100 nM y 500 nM, o menos.

Las secuencias de aminoácidos y Nanobodies[®] proporcionadas por la invención están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de un polipéptido de la invención (también denominado "polipéptido de la invención" o "construcción de la invención"; ambos se usan de manera intercambiable), que pueden comprender o consistir esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] de la invención y que pueden comprender opcionalmente además una o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] adicionales (todos unidos opcionalmente por medio de uno o más conectores adecuados).

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido (también denominado en el presente documento "polipéptido de la invención") que comprende o consiste esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] de la invención (o fragmentos adecuados de los mismos).

El procedimiento de diseño/selección y/o preparación de un polipéptido de la invención, partiendo de una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención, también se denomina en el presente documento "formateado" de dicha secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención; y una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención que se hace parte de un polipéptido de la invención se dice que está "formateado" o que está "en el formato de" dicho polipéptido de la invención. Los ejemplos de modos en los que una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención puede formatearse y ejemplos de tales formatos quedarán claros para el experto basándose en la divulgación en el presente documento; y tales secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] formateados forman un aspecto adicional de la invención.

Por ejemplo, y sin limitación, la una o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] de la invención pueden usarse como unidad de unión en un polipéptido de este tipo, que puede contener opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como unidad de unión (es decir, contra el mismo u otro epítipo en la proteína F de VRSh y/o contra uno o más de otros antígenos, proteínas o dianas distintos de proteína F de VRSh), para proporcionar un polipéptido de la invención monovalente, multivalente, multiparatópico o multiespecífico, respectivamente, todo tal como se describe en el presente documento. La presente invención también se refiere por tanto a un polipéptido que es un polipéptido o construcción monovalente que comprende o que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención. La presente invención también se refiere por tanto a un polipéptido que es un polipéptido o construcción multivalente, tal como por ejemplo un polipéptido o construcción bivalente o trivalente. La presente invención también se refiere a un polipéptido que es un polipéptido o construcción multiespecífico, tal como por ejemplo un polipéptido o construcción biespecífica o trispecífica. La presente invención también se refiere a un polipéptido que es un polipéptido o construcción multiparatópica, tal como por ejemplo un polipéptido o construcción biparatópica o triparatópica.

Por consiguiente, en un aspecto preferido, pero no limitativo, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención comprende al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] adicional, para proporcionar un polipéptido de la invención que comprende al menos dos, tal como dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®], en el que dichas secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] pueden estar unidos opcionalmente por medio de una o más secuencias de conector (tal como se define en el presente documento). Los polipéptidos de la invención que comprenden dos o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®], de los cuales al menos uno, y preferiblemente todos, es/son una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención, también se denominarán en el presente documento polipéptidos "multivalentes" de la invención, y las secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] presentes en tales polipéptidos también se considerará en el presente documento que están en un "formato multivalente". Por ejemplo un polipéptido "bivalente" de la invención comprende dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®], opcionalmente unidos por medio de una secuencia de conector, mientras que un polipéptido "trivalente" de la invención comprende tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®], opcionalmente unidos por medio de dos secuencias de conector; etc.; en el que al menos una de las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] presentes en el polipéptido, y hasta todas las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®]

presentes en el polipéptido, es/son una secuencia de aminoácidos y/o Nanobodies® de la invención.

En un polipéptido multivalente de la invención, las dos o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies® pueden ser iguales diferentes, y pueden estar dirigidos contra el mismo antígeno o determinante antigénico (por ejemplo, contra la(s) misma(s) parte(s) o epítipo(s) o contra diferentes partes o epítopos) o pueden estar dirigidos alternativamente contra diferentes antígenos o determinantes antigénicos; o cualquier combinación adecuada de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido bivalente de la invención puede comprender (a) dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos; (b) una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un primer determinante antigénico de una proteína o un antígeno y una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra el mismo determinante antigénico de dicha proteína o antígeno que es diferente de la primera secuencia de aminoácidos o Nanobody®, (c) una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un primer determinante antigénico de una proteína o un antígeno y una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra otro determinante antigénico de dicha proteína o antígeno; o (d) una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra una primera proteína o antígeno y una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra una segunda proteína o antígeno (es decir, diferente de dicho primer antígeno). De manera similar, un polipéptido trivalente de la invención puede comprender, por ejemplo y sin limitarse a ello, (a) tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos; (b) dos secuencias de aminoácidos o Nanobody® idénticos contra un primer determinante antigénico de un antígeno y una tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un determinante antigénico diferente del mismo antígeno; (c) dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos contra un primer determinante antigénico de un antígeno y una tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno; (d) una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un primer determinante antigénico de un primer antígeno, una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un segundo determinante antigénico de dicho primer antígeno y una tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno; o (e) una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un primer antígeno, una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno, y una tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody® dirigido contra un tercer antígeno diferente de dicho primer y segundo antígeno.

En un aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) de la invención (tal como se describió anteriormente).

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) elegidos de secuencias de aminoácidos que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) elegidos de secuencias de aminoácidos que comprenden dos o más tramos de residuos de aminoácido en los que un tramo se elige de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos un tramo se elige de:

c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

e) SEQ ID NO: 121; y

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

De manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos que forma parte del polipéptido multivalente y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

Polipéptidos multivalentes preferidos (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) elegidos de secuencias de aminoácidos que comprenden tres o más tramos de residuos de aminoácido, en los que el primer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y el tercer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

5 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.
10

En aún otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que consisten esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en los que CDR2 se elige de:
15

a) SEQ ID NO: 102;

20 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

25 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En aún otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que consisten esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en los que CDR2 se elige del grupo que consiste en:
35

a) SEQ ID NO: 102; o

40 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

45 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos una de CDR1 o CDR3 se elige de:

55 - CDR1 elegida del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 98;

60 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;
65

- CDR3 elegida del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121; o

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Preferiblemente, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que consisten esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en los que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102; o

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto específico, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que comprenden al menos SEQ ID NO: 102.

En otro aspecto específico, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de:

5 c) SEQ ID NO: 98;

10 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

15 e) SEQ ID NO: 121;

20 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

30 Los polipéptidos multivalentes preferidos (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos dos tramos de residuos de aminoácido (secuencias de CDR) en los que un tramo se elige del grupo que consiste en los tramos de residuos de aminoácido definidos en c) y d) y en los que el otro tramo se elige del grupo que consiste en los tramos de residuos de aminoácido definidos en e) y f).

35 En un aspecto específico, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) pueden comprender o consistir esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) o al menos tres (preferiblemente idénticos) que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121; o secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

40 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) de la invención (tal como se describió anteriormente). En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) de la invención (tal como se describió anteriormente). En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) de la invención (tal como se describió anteriormente).

50 La invención también proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) elegidos de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

55 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

60 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos

secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies®

5

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

10

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

15

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies®

25

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

30

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

40

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies®

45

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

50

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies®

60

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

65

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

10 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de SEQ ID NO: 65 y 76.

15 La invención también proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

20 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

35 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies®

55 (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

60 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- 5 - SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- 10 - SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;
- 15 - SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;
- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;
- 20 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Polipéptidos preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

30 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

40 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

45 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

50 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

55 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que los siguientes residuos de aminoácido se han mutado:

- 60 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 65 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

10 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

15 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

20 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 65 y 76.

55 La invención también proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

10 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

15 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

25 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

30 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

35 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

45 - SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

50 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

55 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

60 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Polipéptidos preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.
10

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.
15

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.
20

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.
25

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que los siguientes residuos de aminoácido se han mutado:
30

35 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

40 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

45 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

50 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

55 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

60 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

65 La invención también proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente tal como se describió anteriormente en el que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a un ácido aspártico.

En este sentido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] elegido de las siguientes:

5 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

20 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] elegido de una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

25 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

30 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

35 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

40 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

45 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

50 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

55 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

60 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

65 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu

y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

20 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que los siguientes residuos de aminoácido se han mutado:

- Glu1Asp;

30 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

35 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

40 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Glu1Asp y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

45 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

50 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

55 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

60 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

65 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más

preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido bivalente y comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido bivalente y comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o

superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido bivalente y comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] idénticos elegidos de SEQ ID NO: 65 y 76.

La invención también proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

30 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

35 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

45 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido bivalente y comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

50 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

55 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

60 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

65 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] (preferiblemente idénticos) elegidos de las

siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

5 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

15 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

20 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

25 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

30 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

40 Polipéptidos preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® elegidos de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

45 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

50 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

55 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

60 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

65 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste

esencialmente en dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que los siguientes residuos de aminoácido se han mutado:

- 5 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 10 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- 15 - Gly54Asp;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- 20 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- 25 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- 30 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

35 La invención también proporciona un polipéptido bivalente tal como se describió anteriormente en el que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a un ácido aspártico.

En este sentido, la invención también proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® elegido de las siguientes:

- 40 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:
 - 45 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
 - ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos
 - 50 tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

55 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® elegido de una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

60 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

65 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody® que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

- 5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 10 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 15 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 20 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 25 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 30 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 35 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 40 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 45 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que los siguientes residuos de aminoácido se han mutado:
- 50
- Glu1Asp;
 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
 - Glu1Asp y Gly54Asp;
- 65

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

5 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

10 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

15 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

20 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

25 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido trivalente y comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.

40 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

45 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

55 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido trivalente y comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido trivalente y comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 65 y 76.

La invención también proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención es un polipéptido trivalente y comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, la invención un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) elegidos de las siguientes:

25 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

30 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

40 - SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

45 - SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

50 - SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

55 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Polipéptidos preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® elegidos de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

65 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o

consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

10 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

15 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

20 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® (preferiblemente idénticos) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

30 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

35 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

40 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

45 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

50 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

55 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

Un polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 62. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 65. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 76. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 75. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 147. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID NO: 149. Otro polipéptido multivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies® con SEQ ID

NO: 153.

La invención también proporciona un polipéptido trivalente tal como se describió anteriormente en el que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a un ácido aspártico.

En este sentido, la invención también proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] elegido de una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes; Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de

aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- 20 - Glu1Asp;
- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- 25 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 30 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- 35 - Glu1Asp y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- 40 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- 45 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- 50 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

- 55 a) SEQ ID NO: 77-79 y 158;
- b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 77-79 y 158, siempre que:
 - 60 i) las secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] abarcados en dicho polipéptido tengan una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y/o un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y
 - 65 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el

polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

En un aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

5 a) SEQ ID NO: 77-79 y 158;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 77-79 y 158, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody® abarcado en dicho polipéptido tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

15 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

20 Polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 77-79 y 158.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

25 a) SEQ ID NO: 78 y 79;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 78 y 79, siempre que:

30 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody® abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y/o un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

40 En un aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

a) SEQ ID NO: 78 y 79; o

45 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 78 y 79, siempre que:

50 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody® abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Un polipéptido trivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 78. Otro polipéptido trivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 79.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

60 a) SEQ ID NO: 159-161;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody® abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la

posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

10 Polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 159-161.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

15 a) SEQ ID NO: 159-161;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

25 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

30 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

a) SEQ ID NO: 159-161;

35 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando el polipéptido tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 159, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

45 - SEQ ID NO: 160, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

50 - SEQ ID NO: 161, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

60 Polipéptidos trivalentes preferidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 159-161.

65 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu

y Gly54Asp.

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

10 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

15 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

20 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

25 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

30 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

35 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

40 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu,

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

45 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

50 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

55 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 158-161.

60 Durante la producción de los polipéptidos de la invención, se detectó un alto nivel de piroglutamato (pGlu) en el extremo amino-terminal mediante RP-HPLC. Se detectaron niveles de más del 15% de pGlu tras la fermentación y los niveles de pGlu aumentaron regularmente tras el almacenamiento durante estudios de estabilidad. Una modificación de este tipo conduce a heterogeneidad del producto final y es necesario evitarla. El control/prevencción de la formación de pGlu es por tanto crítico para mantener proteínas terapéuticas dentro de sus especificaciones fijadas. Se necesitan condiciones de almacenamiento y/o formulaciones líquidas específicas para proteínas con un

65

ácido glutámico N-terminal minimizando así la formación de ácido piro-glutámico.

En la presente invención, se eliminó la posibilidad de modificación postraducciona de pGlu del extremo N-terminal cambiando el ácido glutámico N-terminal (E) [HOOC-(CH₂)₂-proteína] a un ácido aspártico (D) [HOOC-CH₂-proteína] que conduce a estabilidad de producto aumentada. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a polipéptidos tal como se describió anteriormente en los que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a un ácido aspártico.

La presente invención proporciona varios polipéptidos de secuencia optimizada que muestran estabilidad aumentada tras almacenamiento durante estudios de estabilidad. Por consiguiente, la invención proporciona un polipéptido trivalente tal como se describió anteriormente, en el que el primer aminoácido (ácido glutámico) se ha cambiado a ácido aspártico.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

a) SEQ ID NO: 142-145 y 162-165;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 142-145 y 162-165, siempre que:

i) la primera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1; y

ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Un polipéptido trivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 142. Otro polipéptido trivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 143. Otro polipéptido trivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 144. Otro polipéptido trivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 145. Otro polipéptido trivalente preferido de la invención comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 162-165.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 77, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 78, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 79, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 158, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 159, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 160, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 161, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

5 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

10 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

15 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

20 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico (Glu1Asp).

25 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Glu1Asp
- 35 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 40 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 45 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- Glu1Asp y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- 50 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 55 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- 60 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Gln y Arg105Gln.

65 En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 143. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145. En otro aspecto preferido, el polipéptido de la invención consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 162-165.

5 Polipéptidos con las secuencias de aminoácidos y secuencias de polipéptido tal como se describió anteriormente han mostrado propiedades ventajosas para uso como agentes profilácticos, terapéuticos y/o farmacológicamente activos tales como, por ejemplo, estabilidad mejorada, menos inmunogenicidad, características de unión mejoradas (adecuadamente medidas y/o expresadas como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente),
10 velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento), afinidad mejorada y/o aidez mejorada por proteína F de VRSh y/o eficacia y/o potencia mejoradas para neutralizar VRSh.

15 Más en particular, estos polipéptidos y compuestos de la invención pueden unirse a la proteína F de VRSh con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} , y/o velocidad de k_{dis} , o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) preferiblemente de manera que:

20 - se unen a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 100 nM a 0,1 nM o menos, preferiblemente de 10 nM a 0,1 nM o menos, más preferiblemente de 1 nM a 0,1 nM o menos;

y/o de manera que:

25 - se unen a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} , de entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o más;

y/o de manera que:

30 - se unen a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} , de entre $10^{-2} s^{-1}$ ($t_{1/2}=0,69$ s) y $10^{-4} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente de entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-4} s^{-1}$, más preferiblemente de entre $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-4} s^{-1}$, o inferior.

35 Algunos valores de CI_{50} preferidos para la unión de los polipéptidos de la invención a la proteína F de VRSh quedarán claros a partir de la descripción adicional y ejemplos en el presente documento.

Los ensayos para determinar la CI_{50} incluyen ensayos de competencia tales como ELISA de competencia (por ejemplo, competencia con Synagis[®] o su fragmento Fab) o más preferiblemente ensayos de neutralización tales como el ensayo de microneutralización descrito por Anderson *et al.* (1985, J. Clin. Microbiol. 22: 1050-1052), una modificación de este ensayo tal como se describe en el ejemplo 6 o un ensayo de reducción de placas tal como se describe por Johnson *et al.* (1997, J. Inf. Dis. 176: 1215-1224), y modificaciones de los mismos.

40 Por ejemplo, en un ensayo de competencia con Synagis[®], los polipéptidos de la invención pueden tener valores de CI_{50} de entre 1 nM y 100 nM, preferiblemente entre 10 nM y 50 nM, o menos.

45 Por ejemplo, en un ensayo de microneutralización de la cepa Long de VRS (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) los polipéptidos de la invención pueden tener valores de CI_{50} de entre 10 pM y 1000 pM, preferiblemente entre 10 pM y 250 pM, más preferiblemente entre 50 pM y 200 pM o menos. En un ensayo de microneutralización, los polipéptidos de la invención pueden tener valores de CI_{50} que son al menos los mismos y preferiblemente mejores, al menos diez veces mejores, preferiblemente veinte veces mejores, más preferiblemente cincuenta veces mejores, incluso más preferiblemente sesenta, setenta, ochenta o más veces mejores en comparación con el valor de CI_{50} obtenido con Synagis[®].

55 La invención también se refiere a un polipéptido o construcción monovalente (también denominado "polipéptido monovalente de la invención" o "construcción monovalente de la invención"), que comprende o que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención. Las construcciones monovalentes preferidas de la invención comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76, tal como una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 65 o 75; una de SEQ ID NO: 138-141; una de SEQ ID NO: 146-153; o una de SEQ ID NO: 154-157. Tales construcciones monovalentes, así como las secuencias de aminoácidos y Nanobodies[®] de la invención pueden usarse para la preparación de un polipéptido de la invención, tal como, por ejemplo, los polipéptidos multivalentes de la invención descritos anteriormente.

60 Los polipéptidos de la invención pueden prepararse generalmente mediante un método que comprende al menos la etapa de unir adecuadamente la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o construcción monovalente de la invención a una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o construcciones monovalentes adicionales de la invención, opcionalmente por medio del uno o más conectores adecuados, para proporcionar el polipéptido de la invención. Los polipéptidos de la invención también pueden prepararse mediante un método que comprende generalmente al

menos las etapas de proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, expresar dicho ácido nucleico de una manera adecuada y recuperar el polipéptido expresado de la invención. Tales métodos pueden realizarse de una manera conocida *per se*, que quedará clara para el experto, por ejemplo basándose en los métodos y las técnicas descritos adicionalmente en el presente documento.

5 Un método para preparar aminoácidos o polipéptidos multivalentes, multiparatópicos y/o multiespecíficos de la invención puede comprender al menos las etapas de unir dos o más secuencias de aminoácidos monovalentes o construcciones monovalentes de la invención y, por ejemplo, uno o más conectores entre sí de una manera adecuada. Las construcciones monovalentes (y conectores) pueden acoplarse mediante cualquier método conocido en la técnica y tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Las técnicas preferidas incluyen la unión de las secuencias de ácido nucleico que codifican las construcciones monovalentes (y conectores) para preparar una construcción genética que expresa la secuencia de aminoácidos o el polipéptido multivalente, multiparatópico y/o multiespecífico. Las técnicas para unir las secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico quedarán claras para el experto, y se hace de nuevo referencia a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente, así como a los ejemplos más adelante.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos, un Nanobody[®] o una construcción monovalente de la invención en la preparación de un polipéptido multivalente de la invención. El método para la preparación de un polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos, un Nanobody[®] o una construcción monovalente de la invención a al menos una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o construcción monovalente adicional de la invención, opcionalmente por medio de uno o más conectores. La secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o construcción monovalente se usa entonces como dominio de unión o unidad de unión para proporcionar y/o preparar el polipéptido multivalente que comprende dos (por ejemplo, en un polipéptido bivalente), tres (por ejemplo, en un polipéptido trivalente) o más (por ejemplo, en un polipéptido multivalente) unidades de unión. En este sentido, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] y construcción monovalente pueden usarse como dominio de unión o unidad de unión para proporcionar y/o preparar un polipéptido multivalente y preferiblemente bivalente o trivalente de la invención que comprende dos, tres o más unidades de unión. Preferiblemente, los dominios de unión o unidades de unión se unen por medio de un conector de manera que el polipéptido multivalente presenta preferiblemente unión intramolecular en comparación con unión intermolecular. También preferiblemente el polipéptido multivalente puede unirse simultáneamente a ambos o los tres sitios de unión en la proteína F de VRS.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos o un Nanobody[®] de la invención (tal como se describió anteriormente) en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención a al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] adicional de la invención, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En un aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

10 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

15 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

20 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76; o

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

35 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

40 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

45 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

50 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

60 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

65 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más

preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

10 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

15 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76.

20 En un aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

25 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

30 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

40 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

45 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

50 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

55 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

65 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las

siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

5 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

15 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

20 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

25 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

30 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

40 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

45 En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

50 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido multivalente.

55 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido multivalente.

60 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido multivalente.

65 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionado de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido multivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- 5 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 10 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 15 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
 - Gly54Asp;
- 20 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 25 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- 30 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,
- 35 en la preparación de un polipéptido multivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las anteriores en la que el aminoácido (ácido glutámico) en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

40 En este sentido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

45 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

55 en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

60 En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 138. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 139. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 140. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 141. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido multivalente

65

comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 154-157.

5 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

10 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

15 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

20 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

25 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

30 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

35 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

40 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

45 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

50 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

55 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

60 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

65 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Glu1Asp;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
 - 5 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
 - 10 - Glu1Asp y Gly54Asp;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
 - 15 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
 - 20 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
 - 25 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,
- en la preparación de un polipéptido multivalente.
- 30 La presente invención también se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® de la invención (tal como se describió anteriormente) en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® de la invención, opcionalmente por medio de un conector.
- 35 Por consiguiente, en un aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:
- a) SEQ ID NO: 60-76;
 - 40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:
 - 45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
 - 50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,
- 55 en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de un conector.
- En un aspecto preferido, las dos secuencias de aminoácidos usadas en la preparación del polipéptido bivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.
- En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:
- 60 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;
 - b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:
 - 65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat);

y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

10 en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de un conector.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

15 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

25 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de un conector.

30 En un aspecto preferido, las dos secuencias de aminoácidos usadas en la preparación de un polipéptido bivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

35 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

50 en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de un conector.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

55 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

60 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos

tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

5 en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de un conector.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

25 en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos usadas en la preparación de un polipéptido bivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

30 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

35 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

50 en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

55 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

60 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

65

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
 - SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
 - SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;
 - SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;
 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;
- (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y
- ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;
- en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.
- En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos usadas en la preparación de un polipéptido bivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.
- En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido bivalente.
- En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido bivalente.
- En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido bivalente.
- En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido bivalente.
- En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de dos secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:
- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- 5 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp; o
 - Gly54Asp;
- 10 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 15 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- 20 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,
 en la preparación de un polipéptido bivalente.
- 25 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las anteriores en la que el aminoácido (ácido glutámico) en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.
- 30 En este sentido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:
- a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
- 35 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:
- i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
- 40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,
- 45 en la preparación de un polipéptido bivalente. El método para la preparación del polipéptido bivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o más conectores.
- 50 En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido bivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 138. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido bivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 139. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido bivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 140. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido bivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 141. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido bivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 154-157.
- 60 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.
- 65 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.
- En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende

o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

5 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

10 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

15 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

20 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

25 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

30 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

35 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

40 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

45 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

50 - Glu1Asp;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

55 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

60 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

65 - Glu1Asp y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

5 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Glu;

10 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

15 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

20 La presente invención también se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención (tal como se describió anteriormente) en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de las secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] de la invención, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

25 En un aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

30 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

40 en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

45 En un aspecto preferido, las tres secuencias de aminoácidos usadas en la preparación del polipéptido trivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

50 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

55 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

65 en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos

(preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

5 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

20 En un aspecto preferido, las tres secuencias de aminoácidos usadas en la preparación de un polipéptido trivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

25 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

30 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

40 en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

45 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

50 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

60 en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dichas secuencias de aminoácidos entre sí, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

En un aspecto preferido, las tres secuencias de aminoácidos usadas en la preparación del polipéptido trivalente comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 65. En otro aspecto preferido, las tres secuencias de aminoácidos usadas en la preparación del polipéptido trivalente comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 76.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

5 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

20 en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos usadas en la preparación de un polipéptido trivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

25 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

30 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

35 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

45 en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) elegidas de las siguientes:

50 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

55 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y/o leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

60 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

65 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85

y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, opcionalmente por medio de uno o dos conectores.

En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos usadas en la preparación de un polipéptido trivalente comprenden o consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de tres secuencias de aminoácidos (preferiblemente idénticas) que comprenden o consisten esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

5 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

10 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

15 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,

en la preparación de un polipéptido trivalente.

20 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 62 en la preparación de SEQ ID NO: 77. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 62 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 62, por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

25 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 65 en la preparación de SEQ ID NO: 78. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 65 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 65, por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

30 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 76 en la preparación de SEQ ID NO: 79. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 76 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 76, por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

35 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 75 en la preparación de SEQ ID NO: 158. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 75 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 75, por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

40 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 147 en la preparación de SEQ ID NO: 159. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 147 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 147, por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

45 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 149 en la preparación de SEQ ID NO: 160. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 149 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 149, por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

50 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 153 en la preparación de SEQ ID NO: 161. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 153 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 153, por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

55 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las anteriores en la que el aminoácido (ácido glutámico) en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En este sentido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos elegida de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición

según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido trivalente. El método para la preparación del polipéptido trivalente comprenderá la unión de dicha secuencia de aminoácidos a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales, opcionalmente por medio de uno o más conectores.

En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido trivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 138. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido trivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 139. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido trivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 140. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido trivalente comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 141. En otro aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos usada en la preparación de un polipéptido trivalente comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 154-157.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende

o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

5 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

10 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Glu1Asp;
- 15 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- 20 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln1018Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 25 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- Glu1Asp y Gly54Asp;
- 30 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 35 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- 40 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,
- 45 en la preparación de un polipéptido trivalente.

50 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 138 en la preparación de SEQ ID NO: 142. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 138 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales (preferiblemente SEQ ID NO: 5), por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

55 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 139 en la preparación de SEQ ID NO: 143. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 139 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales (preferiblemente SEQ ID NO: 62), por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

60 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 140 en la preparación de SEQ ID NO: 144. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 140 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales (preferiblemente SEQ ID NO: 65), por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

65 En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 154 en la preparación de SEQ ID NO: 162. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 154 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales (preferiblemente SEQ ID NO: 75), por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 155 en la preparación de SEQ ID NO: 163. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 155 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales (preferiblemente SEQ ID NO: 147), por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 156 en la preparación de SEQ ID NO: 164. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 156 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales (preferiblemente SEQ ID NO: 149), por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere al uso de SEQ ID NO: 157 en la preparación de SEQ ID NO: 165. El método para la preparación del polipéptido multivalente comprenderá la unión de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 157 a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales (preferiblemente SEQ ID NO: 153), por medio de un conector 15GS (SEQ ID NO: 128).

Los polipéptidos de la invención que contienen al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®], en los que al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] está dirigido contra un primer antígeno (es decir, contra la proteína F de VRSh) y al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] está dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de la proteína F de VRSh), también se denominarán polipéptidos "multiespecíficos" de la invención, y las secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] presentes en tales polipéptidos se considerará también en el presente documento que están en un "formato multiespecífico". Por tanto, por ejemplo, un polipéptido "biespecífico" de la invención es un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención dirigido contra un primer antígeno (es decir, proteína F de VRSh) y al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de la proteína F de VRSh), mientras que un polipéptido "triespecífico" de la invención es un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención dirigido contra un primer antígeno (es decir, proteína F de VRSh), al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de la proteína F de VRSh) y al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] adicional dirigido contra un tercer antígeno (es decir, diferente de tanto la proteína F de VRSh como el segundo antígeno); etc.

Por consiguiente, en su forma más sencilla, un polipéptido biespecífico de la invención es un polipéptido bivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención dirigido contra la proteína F de VRSh, y una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] dirigido contra un segundo antígeno, en el que dicha primera y segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] pueden estar unidos opcionalmente por medio de una secuencia de conector (tal como se define en el presente documento); mientras que un polipéptido triespecífico de la invención en su forma más sencilla es un polipéptido trivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención dirigido contra la proteína F de VRSh, una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] dirigido contra un segundo antígeno y una tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] dirigido contra un tercer antígeno, en el que dicha primera, segunda y tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] pueden estar unidos opcionalmente por medio de una o más, y en particular dos, secuencias de conector.

En un aspecto específico, el polipéptido de la invención es un polipéptido biespecífico, trivalente. Un polipéptido biespecífico, trivalente de la invención en su forma más sencilla puede ser un polipéptido trivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] idénticos contra la proteína F de VRSh y una tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] dirigido contra otro antígeno, en el que dicha primera, segunda y tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] pueden estar unidos opcionalmente por medio de uno o más, y en particular dos, secuencias de conector.

Un ejemplo preferido, pero no limitativo de un polipéptido multiespecífico de la invención comprende al menos una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención y al menos un Nanobody[®] que proporciona una semivida aumentada. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales Nanobodies[®] incluyen Nanobodies[®] dirigidos contra proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, proteína de unión a tiroxina, transferrina (humana), fibrinógeno, una inmunoglobulina tal como IgG, IgE o IgM, o una de las otras proteínas séricas enumeradas en el documento WO 04/003019.

Por ejemplo, para experimentos en ratones, pueden usarse Nanobodies[®] contra seroalbúmina murina (MSA), mientras que para uso farmacéutico, pueden usarse Nanobodies[®] contra seroalbúmina humana.

Otra realización de la presente invención es una construcción de polipéptido tal como se describió anteriormente en el que dicha al menos una proteína sérica (humana) es cualquiera de seroalbúmina (humana), inmunoglobulinas séricas (humanas), proteína de unión a tiroxina (humana), transferrina (humana), fibrinógeno (humano), etc.

5 Por consiguiente, en un aspecto específico, el polipéptido de la invención es un polipéptido biespecífico que comprende una primera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención contra proteína F de VRSh y una segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] dirigido contra seroalbúmina (humana), en el que dicha primera y segunda secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] pueden estar unidas opcionalmente por medio de una secuencia de conector.

10 En otro aspecto específico, el polipéptido de la invención es un polipéptido biespecífico, trivalente, que comprende dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] idénticos de la invención contra proteína F de VRSh y una tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] dirigido contra seroalbúmina (humana), en el que dicha primera, segunda y tercera secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] pueden estar unidos opcionalmente por medio de una o más, y en particular dos, secuencias de conector.

15 En otro aspecto específico, el polipéptido de la invención es un polipéptido biespecífico, tetravalente, que comprende tres secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] idénticos de la invención contra proteína F de VRSh y una cuarta secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] dirigido contra seroalbúmina (humana), en el que dicha primera, segunda, tercera y cuarta secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] pueden estar unidos opcionalmente por medio de una o más, y en particular dos o tres, secuencias de conector.

20 Según un aspecto específico, pero no limitativo de la invención, los polipéptidos de la invención contienen, además de la una o más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] de la invención, al menos un Nanobody[®] contra seroalbúmina humana. Estos Nanobodies[®] contra seroalbúmina humana pueden ser tal como se describe generalmente en las solicitudes de Ablynx N.V. mencionadas anteriormente (véase, por ejemplo, el documento WO 04/062551). Algunos Nanobodies[®] particularmente preferidos que proporcionan una semivida aumentada y que pueden usarse en los polipéptidos de la invención incluyen los Nanobodies[®] ALB-1 a ALB-10 divulgados en el documento WO 06/122787 (véanse las tablas II y III) de los cuales se prefiere particularmente ALB-8 (SEQ ID NO: 25 62 en el documento WO 06/122787).

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto o construcción, y en particular a una proteína o polipéptido (también denominado en el presente documento "compuesto de la invención") que comprende o consiste esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y/o polipéptidos de la invención (o fragmentos adecuados de los mismos), y opcionalmente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión. Tal como quedará claro para el experto a partir de la divulgación adicional en el presente documento, tales grupos, residuos, restos, unidades de unión o secuencias de aminoácidos adicionales pueden proporcionar o no una funcionalidad adicional a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención (y/o al compuesto, construcción o polipéptido en el que está presente) y puede modificar o no las propiedades de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] y/o polipéptido de la invención.

35 Tales grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden ser, por ejemplo, grupos químicos, residuos, restos, que pueden ser o no por sí mismos biológica y/o farmacológicamente activos. Por ejemplo, y sin limitación, tales grupos pueden unirse a la una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y/o polipéptidos de la invención para proporcionar un "derivado" de una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] y/o polipéptido de la invención, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

40 También dentro del alcance de la presente invención están compuestos o construcciones que comprenden o consisten esencialmente en uno o más derivados tal como se describe en el presente documento, y opcionalmente comprenden además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos por medio de uno o más conectores. Preferiblemente, dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de aminoácidos.

45 En los compuestos, construcciones o polipéptidos descritos anteriormente, la una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y/o polipéptidos de la invención y el uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden unirse directamente entre sí y/o por medio de uno o más conectores o espaciadores adecuados. Por ejemplo, cuando el uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de aminoácidos, los conectores también pueden ser secuencias de aminoácidos, de modo que el compuesto, construcción o polipéptido resultante es una (proteína) de fusión o (polipéptido) de fusión.

50 Un compuesto o construcción de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, que está fusionado en su extremo amino-terminal, en su extremo carboxilo-terminal o tanto en su extremo amino-terminal como en su extremo carboxilo-terminal a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, es decir, para proporcionar una proteína de fusión que comprende dicha secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención y la una o más secuencias de aminoácidos adicionales.

55 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, alterar o influir de otro modo en las propiedades (biológicas) de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, y pueden o no añadir una funcionalidad adicional a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o el polipéptido de la invención.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos adicional es tal que confiere una o más propiedades deseadas o funcionalidades a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o el polipéptido de la invención.

5 Un ejemplo de tales secuencias de aminoácidos quedará claro para el experto, y puede comprender generalmente todas las secuencias de aminoácidos que se usan en fusiones de péptidos basadas en anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos (incluyendo pero sin limitarse a ScFv y anticuerpos de un único dominio). Se hace referencia por ejemplo a la revisión de Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136 (2005).

10 Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de este tipo puede ser una secuencia de aminoácidos que aumenta la semivida, la solubilidad o la absorción, reduce la inmunogenicidad o la toxicidad, elimina o atenúa efectos secundarios no deseados, y/o confiere otras propiedades ventajosas a y/o reduce las propiedades no deseadas de los compuestos de la invención, en comparación con la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención *per se*. Algunos ejemplos no limitativos de tales secuencias de aminoácidos son proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana (véase, por ejemplo, el documento WO 00/27435) o moléculas hapténicas (por ejemplo, 15 haptenos que se reconocen por anticuerpos circulantes, véase, por ejemplo, el documento WO 98/22141).

La secuencia de aminoácidos adicional también puede proporcionar un segundo sitio de unión, sitio de unión que puede estar dirigido contra cualquier proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo deseado (incluyendo pero sin limitarse a la misma proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo contra el 20 que está dirigido la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] de la invención, o una proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo diferente). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos adicional puede proporcionar un segundo sitio de unión que está dirigido contra una proteína sérica (tal como, por ejemplo, albúmina sérica humana u otra proteína sérica tal como IgG), para proporcionar una semivida aumentada en suero. Tales secuencias de aminoácidos incluyen por ejemplo Nanobodies[®], así como los péptidos pequeños y proteínas de 25 unión descritos en los documentos WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 02/076489 y los dAb descritos en los documentos WO 03/002609 y WO 04/003019. Se hace también referencia a Harmsen *et al.*, *Vaccine*, 23 (41); 4926-42, 2005, así como al documento EP 0 368 684, así como a los documentos WO 08/028977, WO 08/043821, WO 08/043822 de Ablynx N.V. y el documento WO 08/068280.

30 Tales secuencias de aminoácidos pueden estar en particular dirigidas contra seroalbúmina (y más en particular seroalbúmina humana) y/o contra IgG (y más en particular IgG humana). Por ejemplo, tales secuencias de aminoácidos pueden ser secuencias de aminoácidos que están dirigidas contra seroalbúmina (humana) y secuencias de aminoácidos que pueden unirse a residuos de aminoácido en seroalbúmina (humana) que no están implicados en la unión de seroalbúmina a FcRn (véase, por ejemplo, el documento WO 06/0122787) y/o secuencias 35 de aminoácidos que son capaces de unirse a residuos de aminoácido en seroalbúmina que no forman parte del dominio III de seroalbúmina (véase de nuevo, por ejemplo, el documento WO 06/0122787); secuencias de aminoácidos que tienen o pueden proporcionar una semivida aumentada (véase, por ejemplo, el documento WO 08/028977); secuencias de aminoácidos contra seroalbúmina humana que reaccionan de manera cruzada con seroalbúmina de al menos una especie de mamífero, y en particular con al menos una especie de primate (tal como, 40 sin limitación, monos del género *Macaca* (tal como, y en particular, macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) y/o macacos de la India (*Macaca mulatta*) y babuino (*Papio ursinus*), se hace referencia de nuevo al documento WO 08/028977); secuencias de aminoácidos que pueden unirse a seroalbúmina de una manera independiente del pH (véase, por ejemplo, el documento WO 08/043821) y/o secuencias de aminoácidos que son agentes de unión 45 condicionales (véase, por ejemplo, el documento WO 08/043822).

Según otra realización, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden comprender una o más partes, fragmentos o dominios de anticuerpos de 4 cadenas convencionales (y en particular anticuerpos humanos) y/o 50 anticuerpos de cadena pesada. Por ejemplo, aunque habitualmente se prefiere menos, una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención puede estar unido a un dominio de V_H o V_L convencional (preferiblemente humano) o a un análogo natural o sintético de un dominio de V_H o V_L, de nuevo opcionalmente por medio de una secuencia de conector (incluyendo pero sin limitarse a otros anticuerpos de (un único) dominio, tales como los dAb descritos por Ward *et al.*).

Por consiguiente, en el compuesto o construcción de la invención, dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden elegirse del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos 55 que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como un anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies[®].

60 En un aspecto específico de la invención, el compuesto, construcción o polipéptido de la invención que comprende al menos una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención puede tener una semivida aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido correspondiente de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales compuestos, construcciones y polipéptidos quedarán claros para el experto basándose en la divulgación adicional en el presente documento, y por ejemplo 65 comprenden secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención que se han modificado químicamente para aumentar la semivida de los mismos (por ejemplo, por medio de pegilación); o compuestos de la

invención que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención que está unido a al menos un resto (y en particular al menos una secuencia de aminoácidos) que aumenta la semivida de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención. Los ejemplos de compuestos de la invención que comprenden tales restos que prolongan la semivida quedarán claros para el experto basándose en la divulgación adicional en el presente documento; y por ejemplo incluyen, sin limitación, compuestos en los que la una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención están unidos adecuadamente a una o más proteínas séricas o fragmentos de las mismas (tales como seroalbúmina o fragmentos adecuados de la misma) o a una o más unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas (tales como, por ejemplo, Nanobodies[®] o anticuerpos de (un único) dominio que pueden unirse a proteínas séricas tales como seroalbúmina, inmunoglobulinas séricas tales como IgG, o transferrina); compuestos en los que una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención está unido a una parte de Fc (tal como un Fc humano) o una parte o fragmento adecuado del mismo; o compuestos en los que la una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención están unidos adecuadamente a una o más proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas (tales como, sin limitación, las proteínas y péptidos descritos en los documentos WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489).

La al menos una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido también puede estar unido a uno o más dominios C_H1, C_H2 y/o C_H3 (preferiblemente humanos), opcionalmente por medio de una secuencia de conector. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido unido a un dominio C_H1 adecuado podría usarse por ejemplo, junto con cadenas ligeras adecuadas, para generar fragmentos de anticuerpos/estructuras análogas a fragmentos F(ab')₂ o fragmentos Fab convencionales, pero en los que uno o (en caso de un fragmento F(ab')₂) uno o ambos de los dominios V_H convencionales se han reemplazado por una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención. Además, dos secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] podrían estar unidos a un dominio C_H3 (opcionalmente por medio de un conector) para proporcionar una construcción con semivida aumentada *in vivo*.

Según un aspecto específico, una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención pueden estar unidos (opcionalmente por medio de una región de bisagra o conector adecuado) a uno o más dominios constantes (por ejemplo, 2 o 3 dominios constantes que pueden usarse como parte de/para formar una parte de Fc), a una parte de Fc y/o a una o más partes de anticuerpo, fragmentos o dominios que confieren una o más funciones efectoras a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención y/o pueden conferir la capacidad de unirse a uno o más receptores de Fc. Por ejemplo, para este fin, y sin limitarse al mismo, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o más dominios C_H2 y/o C_H3 de un anticuerpo, tal como de un anticuerpo de cadena pesada (tal como se describe en el presente documento) y más preferiblemente de un anticuerpo de 4 cadenas humano convencional; y/o pueden formar (parte de) una región Fc, por ejemplo de IgG (por ejemplo, de IgG1, IgG2; IgG3 o IgG4), de IgE o de otra Ig humana tal como IgA, IgD o IgM. Por ejemplo, el documento WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprenden un dominio V_{HH} de camélido o un derivado humanizado del mismo (es decir, un Nanobody[®]), en el que el dominio C_H2 y/o C_H3 de camélido se ha reemplazado por dominios C_H2 y C_H3 humanos, para proporcionar una inmunoglobulina que consiste en 2 cadenas pesadas que comprenden cada una un Nanobody[®] y dominios C_H2 y C_H3 humanos (pero no un dominio C_H1), inmunoglobulina que tiene la función efectora proporcionada por los dominios C_H2 y C_H3 e inmunoglobulina que puede funcionar sin la presencia de ninguna cadena ligera. Otras secuencias de aminoácidos que pueden unirse adecuadamente a las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención para proporcionar una función efectora quedarán claras para el experto, y pueden elegirse basándose en la(s) función/funciones efectora(s) deseada(s). Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos WO 04/058820, WO 99/42077, WO 02/056910 y WO 05/017148, así como a la revisión de Holliger y Hudson, citado anteriormente; y al documento WO 09/068628. El acoplamiento de una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención a una parte de Fc también puede conducir a una semivida aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido correspondiente de la invención. Para algunas aplicaciones, el uso de una parte de Fc y/o de dominios constantes (es decir, dominios C_H2 y/o C_H3) que confieren semivida aumentada sin ninguna función efectora biológicamente significativa también puede ser adecuado o incluso preferido. Otras construcciones adecuadas que comprenden una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos y uno o más dominios constantes con semivida aumentada *in vivo* quedarán claros para el experto, y pueden comprender, por ejemplo, secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos unidos a un dominio C_H3, opcionalmente por medio de una secuencia de conector. Generalmente, cualquier proteína de fusión o derivado con semivida aumentada tendrá preferiblemente un peso molecular de más de 50 kD, el valor de corte para la absorción renal.

En otro aspecto específico, pero no limitativo, con el fin de formar un compuesto de la invención, pueden unirse una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención (opcionalmente por medio de una región de bisagra o conector adecuado) a dominios constantes que se producen de manera natural, sintéticos o semisintéticos (o análogos, variantes, mutantes, partes o fragmentos de los mismos) que tienen una tendencia reducida (o esencialmente no tienden) a autoasociarse para dar dímeros (es decir, en comparación con dominios constantes que se producen de manera natural en anticuerpos de 4 cadenas convencionales). Tales variantes de cadena de Fc monoméricas (es decir, que no se autoasocian), o fragmentos de las mismas, quedarán claras para el experto. Por ejemplo, Helm *et al.*, J Biol Chem 1996 271 7494, describen variantes de cadena de Fc monoméricas

que pueden usarse en las cadenas de polipéptido de la invención.

Además, tales variantes de cadena de Fc monoméricas son preferiblemente tales que son capaces de unirse al complemento o el/los receptor(es) de Fc relevante(s) (dependiendo de la parte de Fc de la que se derivan), y/o tales que todavía tienen alguna o todas las funciones efectoras de la parte de Fc de la que se derivan (o a un nivel reducido todavía adecuado para el uso previsto). Alternativamente, en una cadena de polipéptido de este tipo de la invención, la cadena de Fc monomérica puede usarse para conferir semivida aumentada a la cadena de polipéptido, en cuyo caso la cadena de Fc monomérica puede tener también ninguna o esencialmente ninguna función efectora.

Generalmente, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención (o compuestos, construcciones o que comprenden los mismos) con semivida aumentada tienen preferiblemente una semivida que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces mayor que la semivida de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención correspondiente *per se*. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones o polipéptidos de la invención con semivida aumentada pueden tener una semivida que está aumentada con más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención correspondiente *per se*.

En un aspecto preferido, pero no limitativo de la invención, tales secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuesto, construcciones o polipéptidos de la invención presentan una semivida sérica en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más. Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de la invención pueden tener una semivida de al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), a preferiblemente al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente de 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

Las secuencias de aminoácidos adicionales pueden formar también una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o los polipéptidos de la invención de una célula huésped tras la síntesis (por ejemplo, para proporcionar una pre-, pro- o preproforma del polipéptido de la invención, dependiendo de la célula huésped usada para expresar el polipéptido de la invención).

La secuencia de aminoácidos adicional también puede formar una secuencia o señal que permite que la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención se dirija hacia y/o penetre o entre en órganos, tejidos, células o partes o compartimentos específicos de células, y/o que permite que la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención penetre o cruce una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células epiteliales. Ejemplos adecuados de tales secuencias de aminoácidos quedarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los vectores "Peptrans" mencionados anteriormente, las secuencias descritas por Cardinale *et al.* y las secuencias de aminoácidos y fragmentos de anticuerpos conocidos *per se* que pueden usarse para expresar o producir los Nanobodies[®] y polipéptidos de la invención denominados "intracuerpos", por ejemplo tal como se describe en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618, US 7.004.940, 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 descritas en los mismos.

Una proteína, polipéptido, compuesto o construcción de este tipo también puede estar en esencialmente forma aislada (tal como se define en el presente documento).

Los compuestos o polipéptidos de la invención pueden prepararse generalmente mediante un método que comprende al menos la etapa de unir adecuadamente la una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], construcciones monovalentes y/o polipéptidos de la invención a uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales, opcionalmente por medio del uno o más conectores adecuados, para proporcionar el compuesto o polipéptido de la invención. Los polipéptidos de la invención también pueden prepararse mediante un método que comprende generalmente al menos las etapas de proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, expresar dicho ácido nucleico de una manera adecuada y recuperar el polipéptido expresado de la invención. Tales métodos pueden realizarse de una manera conocida *per se*, que quedará clara para el experto, por ejemplo basándose en los métodos y las técnicas descritos adicionalmente en el presente documento.

Los conectores o espaciadores adecuados para su uso en polipéptidos o construcciones multivalentes y/o multiespecíficas quedarán claros para el experto, y pueden ser generalmente cualquier conector o espaciador usado en la técnica para unir secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, dicho conector o espaciador es adecuado para su uso en la construcción de proteínas o polipéptidos que están destinados a uso farmacéutico.

Algunos espaciadores particularmente preferidos incluyen los espaciadores y conectores que se usan en la técnica

5 para unir fragmentos de anticuerpos o dominios de anticuerpo. Estos incluyen los conectores mencionados en los antecedentes de la técnica generales mencionados anteriormente, así como, por ejemplo, conectores que se usan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos de ScFv (en este sentido, sin embargo, debe indicarse que, mientras que en diacuerpos y en fragmentos de ScFv, la secuencia de conector usada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permiten que los dominios de V_H y V_L pertinentes se junten para formar el sitio de unión a antígeno completo, no hay ninguna limitación particular en la longitud o la flexibilidad del conector usado en el polipéptido de la invención, puesto que cada secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] por sí mismo forma un sitio de unión a antígeno completo).

10 Por ejemplo, un conector puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada, y en particular secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferiblemente entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos de aminoácido. Algunos ejemplos preferidos de tales secuencias de aminoácidos incluyen conectores de gly-ser, por ejemplo del tipo $(gly_xser_y)_z$, tal como (por ejemplo, $(gly_4ser)_3$ o $(gly_3ser_2)_3$, tal como se describe en el documento WO 99/42077, regiones de tipo bisagra tales como las regiones de bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural o secuencias similares (tal como se describe en el documento WO 94/04678).

15 Algunos otros conectores particularmente preferidos son poli-alanina (tal como AAA), así como los conectores mencionados en la tabla A-7, de los cuales se prefiere particularmente GS15.

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

25 Se abarca dentro del alcance de la invención que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del/de los conector(es) usado(s) (aunque no crítico, como es habitualmente para los conectores usados en fragmentos ScFv) pueden tener alguna influencia sobre las propiedades del polipéptido final de la invención, incluyendo pero sin limitarse a la afinidad, especificidad o avidéz por la proteína F de VRSh, o por uno o más de los demás antígenos. Basándose en la divulgación en el presente documento, el experto será capaz de determinar el/los conector(es) óptimo(s) para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente tras algunos experimentos de rutina limitados.

30 También está dentro del alcance de la invención que el/los conector(es) usado(s) confieran una o más de otras propiedades favorables o funcionalidad a los polipéptidos de la invención, y/o proporcionen uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la unión de grupos funcionales (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento para los derivados de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos y polipéptidos de la invención). Por ejemplo, conectores que contienen uno o más residuos de aminoácido cargados pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que conectores que forman o contienen etiquetas o epítomos pequeños pueden usarse para los fines de detección, identificación y/o purificación. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto será capaz de determinar los conectores óptimos para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente tras algunos experimentos de rutina limitados.

35 Finalmente, cuando se usan dos o más conectores en los polipéptidos de la invención, estos conectores pueden ser iguales o diferentes. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto será capaz de determinar los conectores óptimos para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente tras algunos experimentos de rutina limitados.

40 Habitualmente, por facilidad de expresión y producción, un polipéptido de la invención será un polipéptido lineal. Sin embargo, la invención en su sentido más amplio no se limita a ello. Por ejemplo, cuando un polipéptido de la invención comprende tres de más secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®], es posible unirlos mediante el uso de un conector con tres o más "brazos", estando unido cada "brazo" a una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®], para proporcionar una construcción "con forma de estrella". También es posible, aunque habitualmente menos preferido, usar construcciones circulares.

45 Tal como quedará claro también a partir de la divulgación en el presente documento, también está dentro del alcance de la invención usar partes o fragmentos, o combinaciones de dos o más partes o fragmentos, de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención tal como se define en el presente documento, y en particular partes o fragmentos de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 o los polipéptidos de SEQ ID NO: 77-79, 142-145 y 158-165. Por tanto, según una realización de la invención, el término "secuencia de aminoácidos de la invención", "Nanobody[®] de la invención" y "polipéptido de la invención" en su sentido más amplio también cubre tales partes o fragmentos.

50 Generalmente, tales partes o fragmentos de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención (incluyendo variantes de los mismos tal como se define en el presente documento) tienen secuencias de aminoácidos en las que, en comparación con la secuencia de aminoácidos de la correspondiente secuencia de aminoácidos de longitud completa o Nanobody[®] de la invención, uno o más de los residuos de aminoácido en el extremo N-terminal, uno o más residuos de aminoácido en el extremo C-terminal, uno o más residuos de aminoácido

internos contiguos, o cualquier combinación de los mismos, se han delecionado y/o eliminado.

Las partes o fragmentos son preferiblemente tales que pueden unirse al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh, con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} . y/o velocidad de k_{dis} ., o alternativamente como valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento.

En particular, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y partes o fragmentos son preferiblemente tales que:

- se unen a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos;

y/o tales que:

- se unen a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} . de entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ a aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente de entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o más;

y/o tales que:

se unen a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} . de entre $10^{-2} s^{-1}$ ($t_{1/2}=0,69 s$) y $10^{-4} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente de entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-4} s^{-1}$, o inferior.

La afinidad de las partes o fragmentos contra la proteína F de VRSh puede determinarse de una manera conocida *per se*, por ejemplo usando el ensayo descrito en el presente documento.

Tales partes o fragmentos tendrán también habitualmente una potencia y/o eficacia de neutralización de VRSh tal como se define en el presente documento.

Cualquier parte o fragmento es preferiblemente tal que comprende al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, más preferiblemente al menos 30 residuos de aminoácido contiguos, tal como al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa, Nanobody[®] o polipéptido correspondiente de la invención.

Además, cualquier parte o fragmento es tal que comprende preferiblemente al menos una de las CDR (y preferiblemente al menos CDR3 o parte de la misma) y al menos otra CDR (es decir, CDR1 o CDR2) o al menos parte de la misma, preferiblemente conectada por secuencia(s) de armazón adecuada(s) o al menos parte de la(s) misma(s). Más preferiblemente, cualquier parte o fragmento es tal que comprende al menos una de las CDR (y preferiblemente al menos CDR3 o parte de la misma) y al menos parte de las dos CDR restantes, de nuevo preferiblemente conectadas por secuencia(s) de armazón adecuada(s) o al menos parte de la(s) misma(s).

Según otra realización particularmente preferida, pero no limitativa, una parte o fragmento de este tipo comprende al menos CDR3, tal como FR3, CDR3 y FR4 del Nanobody[®] de longitud completa correspondiente de la invención, es decir, tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 03/050531 (Lasters *et al.*).

Tal como ya se mencionó anteriormente, también es posible combinar dos o más de tales partes o fragmentos (es decir, de las mismas o diferentes secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] de la invención), es decir, para proporcionar partes o fragmentos adicionales (tal como se define en el presente documento) de una secuencia de aminoácidos, un Nanobody[®] o un polipéptido de la invención. También es posible, por ejemplo, combinar una o más partes o fragmentos de una secuencia de aminoácidos, un Nanobody[®] o un polipéptido de la invención con una o más partes o fragmentos de un dominio de V_H humano.

Según una realización preferida, las partes o fragmentos tienen un grado de identidad de secuencia de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente al menos el 80%, tal como al menos el 90%, el 95% o el 99% o más con una de las secuencias de aminoácidos o Nanobodies[®] de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 o con uno de los polipéptidos de SEQ ID NO: 77-79, 142-145 y 158-165.

Las partes y fragmentos, y secuencias de ácido nucleico que codifican los mismos, pueden proporcionarse y opcionalmente combinarse de cualquier manera conocida *per se*. Por ejemplo, tales partes o fragmentos pueden obtenerse insertando un codón de terminación en un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de tamaño completo de la invención, y luego expresando el ácido nucleico así obtenido de una manera conocida *per se* (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento). Alternativamente, pueden obtenerse ácidos nucleicos que codifican tales partes o fragmentos restringiendo adecuadamente un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de tamaño completo de la invención o sintetizando un ácido nucleico de este tipo de una manera conocida *per se*. Las partes o fragmentos también

pueden proporcionarse usando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas *per se*.

La invención en su sentido más amplio también comprende derivados de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o polipéptidos de la invención. Tales derivados pueden obtenerse generalmente mediante modificación, y en particular mediante modificación química y/o biológica (por ejemplo, enzimática) de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o polipéptidos de la invención y/o de uno o más de los residuos de aminoácido que forman las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o polipéptidos de la invención.

Los ejemplos de tales modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos, secuencia de Nanobody[®], compuesto o secuencias de polipéptido que pueden modificarse de tal manera (es decir, o bien en la estructura principal de la proteína pero preferiblemente en una cadena lateral), métodos y técnicas que pueden usarse para introducir tales modificaciones y los posibles usos y ventajas de tales modificaciones quedarán claros para el experto.

Por ejemplo, una modificación de este tipo puede implicar la introducción (por ejemplo, mediante unión covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, residuos o restos en o sobre la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, y en particular de uno o más grupos funcionales, residuos o restos que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención. Los ejemplos de tales grupos funcionales quedarán claros para el experto.

Por ejemplo, tal modificación puede comprender la introducción (por ejemplo, mediante unión covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales que aumentan la semivida, la solubilidad y/o la absorción de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, que reducen la inmunogenicidad y/o la toxicidad de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, que eliminan o atenúan cualquier efecto secundario no deseado de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, y/o que confieren otras propiedades ventajosas a y/o reducen las propiedades no deseadas de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención; o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. Los ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para introducirlos quedarán claros para el experto, y pueden comprender generalmente todos los grupos funcionales y las técnicas mencionados en los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente en el presente documento así como los grupos funcionales y las técnicas conocidos *per se* para la modificación de proteínas farmacéuticas, y en particular para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (incluyendo ScFv y anticuerpos de un único dominio), para lo que se hace referencia por ejemplo a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Tales grupos funcionales pueden estar, por ejemplo, directamente unidos (por ejemplo, covalentemente) a una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, u opcionalmente por medio de un espaciador o conector adecuado, tal como quedará claro de nuevo para el experto.

Una de las técnicas más ampliamente usadas para aumentar la semivida y/o reducir la inmunogenicidad de proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero adecuado farmacológicamente aceptable, tal como poli(etilenglicol) (PEG) o derivados del mismo (tal como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). Generalmente, puede usarse cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de (un único) dominio y ScFv); se hace referencia a por ejemplo Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); de Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), de Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en el documento WO 04/060965. También están disponibles comercialmente reactivos para la pegilación de proteínas, por ejemplo de Nektar Therapeutics, EE. UU.

Preferiblemente, se usa pegilación dirigida al sitio, en particular por medio de un residuo de cisteína (véase por ejemplo Yang *et al.*, Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este fin, puede unirse PEG a un residuo de cisteína que se produce de manera natural en una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención puede modificarse para introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG puede fusionarse al extremo N- y/o C-terminal de una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, todo usando genotecnología de proteínas conocidas *per se* por el experto.

Preferiblemente, para las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o polipéptidos 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 intervalo de 20.000-80.000.

Otra modificación, habitualmente menos preferida, comprende glucosilación unida a N o unida a O, habitualmente como parte de modificación cotraduccional y/o postraduccional, dependiendo de la célula huésped usada para expresar la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención.

- Aún otra modificación puede comprender la introducción de uno o más marcadores detectables u otros restos o grupos generadores de señal, dependiendo del uso previsto de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido marcado de la invención. Los marcadores adecuados y las técnicas para unirlos, usarlos y detectarlos quedarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina y metales fluorescentes tales como ¹⁵²Eu u otros metales de la serie del lantánido), marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes o marcadores bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radioisótopos (tales como ³H, ¹²⁵I, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C, ⁵¹Cr, ³⁶Cl, ⁵⁷Co, 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 su uso en obtención de imágenes y diagnóstico *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, tales como ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Cr y ⁵⁶Fe, así como cromóforos y enzimas (tales como malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-V-esteroido isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotinaavidina peroxidasa, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa). Otros marcadores adecuados quedarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen restos que pueden detectarse usando espectroscopía de RMN o ESR.
- Tales secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o polipéptidos marcados de la invención pueden usarse por ejemplo para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo inmunoensayos conocidos *per se* tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de tipo sándwich", etc.) así como para fines de obtención de imágenes y diagnóstico *in vivo*, dependiendo de la elección del marcador específico.
- Tal como quedará claro para el experto, otra modificación puede implicar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo para quelar uno de los metales o cationes metálicos a los que se hizo referencia anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen por ejemplo, sin limitación, ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).
- Aún otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que es una parte de una pareja de unión específica, tal como la pareja de unión biotina-(estrept)avidina. Un grupo funcional de este tipo puede usarse para unir la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que está unido a la otra mitad de la pareja de unión, es decir a través de la formación de la pareja de unión. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención puede conjugarse con biotina, y unirse a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido conjugado de este tipo de la invención puede usarse como indicador, por ejemplo en un sistema de diagnóstico en el que se conjuga un agente productor de señal detectable con avidina o estreptavidina. Tales parejas de unión pueden usarse también por ejemplo para unir la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención a un portador, incluyendo portadores adecuados para fines farmacéuticos. Un ejemplo no limitativo son las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8,4, 257 (2000). Tales parejas de unión pueden usarse también para unir un agente terapéuticamente activo a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención.
- Otras posibles modificaciones químicas y enzimáticas quedarán claras para el experto. Tales modificaciones también pueden introducirse para fines de investigación (por ejemplo, para estudiar relaciones de función-actividad). Se hace referencia por ejemplo a Lundblad y Bradshaw, *Biotechnol. Apt Biochem.*, 26, 143-151 (1997).
- Preferiblemente, los derivados son tales que se unen a la proteína F de VRSh, con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como valor de K_D (real o aparente), valor de K_A (real o aparente), velocidad de k_{aso} . y/o velocidad de $k_{dis.}$, o alternativamente como valor de Cl_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento (es decir, tal como se define para las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos o compuestos *per se*). Tales derivados tendrán también habitualmente una potencia y/o eficacia de neutralización de VRSh tal como se define en el presente documento.
- Tal como se mencionó anteriormente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que consisten esencialmente en o comprenden al menos una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención. Por "consisten esencialmente en" quiere decirse que la secuencia de aminoácidos de la proteína o el polipéptido de la invención o bien es exactamente el mismo que la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención o corresponde a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención que tiene un número limitado de residuos de aminoácido, tales como 1-20 residuos de aminoácido, por ejemplo 1-10 residuos de aminoácido y preferiblemente 1-6 residuos de aminoácido, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácido, añadidos al extremo amino-terminal, al extremo carboxilo-terminal, o a tanto el extremo amino-terminal como el extremo carboxilo-terminal de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido.

Dichos residuos de aminoácido pueden o no cambiar, alterar o influir de otra forma en las propiedades (biológicas) de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención y pueden o no añadir funcionalidad adicional a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido. Por ejemplo, tales residuos de aminoácido:

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

10 b) pueden formar una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido a partir de una célula huésped tras la síntesis. Los péptidos líder secretorios adecuados quedarán claros para el experto, y pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Habitualmente, una secuencia líder de este tipo se unirá al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido, aunque la invención en su sentido más amplio no se limita a ello;

15 c) pueden formar una secuencia o señal que permite que la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido se dirija hacia y/o penetre o entre en órganos, tejidos, células, o partes o compartimentos específicos de células, y/o que permite que la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido penetre o cruce una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células epiteliales, un tumor incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de tales secuencias de aminoácidos quedarán claros para el experto. Algunos ejemplos no limitativos son los vectores peptídicos pequeños (“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). Se describen secuencias de aminoácidos C-terminales y N-terminales para el direccionamiento intracelular de fragmentos de anticuerpos por ejemplo por Cardinale *et al.*, *Methods*, 34, 171 (2004). Otras técnicas adecuadas para direccionamiento intracelular implican la expresión y/o el uso de los denominados “intracuerpos” que comprenden una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido de la invención, tal como se menciona más adelante;

30 d) pueden formar una “etiqueta”, por ejemplo una secuencia de aminoácidos o residuo que permite o facilita la purificación de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido, por ejemplo usando técnicas de afinidad dirigidas contra dicha secuencia o residuo. Después de eso, dicha secuencia o residuo puede eliminarse (por ejemplo, mediante escisión química o enzimática) para proporcionar la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o polipéptido (para este fin, la etiqueta puede estar opcionalmente unida a la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o secuencia de polipéptido por medio de una secuencia de conector escindible o contener un motivo escindible). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales residuos son múltiples residuos de histidina, residuos de glutatión y una etiqueta myc tal como AAAEQKLISEEDLNGAA (SEQ ID NO: 111);

40 e) pueden ser uno o más residuos de aminoácido que se han funcionalizado y/o que pueden servir como sitio para la unión de grupos funcionales. Los residuos de aminoácido y grupos funcionales adecuados quedarán claros para el experto e incluyen, pero no se limitan a, los residuos de aminoácido y grupos funcionales mencionados en el presente documento para los derivados de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o polipéptidos de la invención.

45 La invención se refiere además a métodos para preparar las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento.

50 Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse de una manera conocida *per se*, tal como quedará claro para el experto a partir de la descripción adicional en el presente documento. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y polipéptidos de la invención pueden prepararse de cualquier manera conocida *per se* para la preparación de anticuerpos y en particular para la preparación de fragmentos de anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de (un único) dominio y fragmentos ScFv). Algunos métodos preferidos, pero no limitativos para preparar las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y ácidos nucleicos incluyen los métodos y las técnicas descritos en el presente documento.

60 El método para producir una secuencia de aminoácidos de la invención, un Nanobody[®] de la invención, un polipéptido de la invención o una construcción monovalente de la invención puede comprender las siguientes etapas:

65 - la expresión, en un organismo huésped o una célula huésped adecuado (también denominado en el presente documento “huésped de la invención”) o en otro sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifica dicha secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención (también denominado en el presente documento “ácido nucleico de la invención”),

opcionalmente seguido por:

- aislar y/o purificar la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención así obtenido.

5 En particular, un método de este tipo puede comprender las etapas de:

- cultivar y/o mantener un huésped de la invención en condiciones que son tales que dicho huésped de la invención expresa y/o produce al menos una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] y/o polipéptido de la invención;

10 opcionalmente seguido por:

- aislar y/o purificar la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención así obtenido.

15 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos, un Nanobody[®], un polipéptido o una construcción monovalente de la invención (también denominado "ácido nucleico de la invención" o "secuencia de nucleótidos de la invención"). Un ácido nucleico de la invención puede estar en forma de ADN o ARN mono o bicatenario, y está preferiblemente en forma de ADN bicatenario. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser ADN, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codones que se ha adaptado específicamente para la expresión en el organismo huésped o la célula huésped previsto).

20 Según una realización de la invención, el ácido nucleico de la invención está en forma esencialmente aislada, tal como se define en el presente documento. 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 de nuevo puede estar en forma esencialmente aislada.

25 Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse u obtenerse de una manera conocida *per se*, basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y/o polipéptidos de la invención facilitada en el presente documento, y/o pueden aislarse a partir de una fuente natural adecuada. Además, tal como quedará claro para el experto, para preparar un ácido nucleico de la invención, también varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] y por ejemplo ácidos nucleicos que codifican uno o más conectores pueden unirse entre sí de una manera adecuada.

30 Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la invención quedarán claras para el experto y pueden incluir por ejemplo, pero sin limitarse a, síntesis de ADN automatizada; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias sintéticas y/o que se producen de manera natural (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que conducen a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que pueden digerirse y/o ligarse fácilmente usando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones mediante una reacción de PCR usando uno o más cebadores "con apareamientos erróneos". Estas y otras técnicas quedarán claras para el experto, y se hace referencia de nuevo a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente, así como a los ejemplos a continuación.

35 El ácido nucleico de la invención puede estar también en forma de, estar presente en y/o ser parte de una construcción genética, tal como quedará claro para el experto en la técnica. Tales construcciones genéticas comprenden generalmente al menos un ácido nucleico de la invención que está opcionalmente unido a uno o más elementos de construcciones genéticas conocidas *per se*, tal como, por ejemplo, uno o más elementos reguladores adecuados (tales como promotor(es), potenciador(es), terminador(es) adecuado(s), etc.) y los elementos de construcciones genéticas adicionales a los que se hace referencia en el presente documento. Tales construcciones genéticas que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención también se denominarán en el presente documento "construcciones genéticas de la invención".

40 Las construcciones genéticas de la invención pueden ser ADN o ARN, y son preferiblemente ADN bicatenario. Las construcciones genéticas de la invención pueden estar también en una forma adecuada para la transformación del organismo huésped o la célula huésped previsto, en una forma adecuada para su integración en el ADN genómico de la célula huésped prevista o en una forma adecuada para replicación, mantenimiento y/o herencia independiente en el organismo huésped previsto. Por ejemplo, las construcciones genéticas de la invención pueden estar en forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector vírico o transposón. En particular, el vector puede ser un vector 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 limitativa, una construcción genética de la invención comprende

65 a) al menos un ácido nucleico de la invención; operativamente conectado a

b) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado;

y opcionalmente también

c) uno o más elementos de construcciones genéticas adicionales conocidas *per se*;

en la que los términos “elemento regulador”, “promotor”, “terminador” y “operativamente conectado” tienen su significado habitual en la técnica (tal como se describe adicionalmente en el presente documento); y en la que dichos “elementos adicionales” presentes en las construcciones genéticas pueden ser, por ejemplo, secuencias de UTR en 3’ o 5’, secuencias líder, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes indicadores, y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficacia de) la transformación o integración. Estos y otros elementos adecuados para tales construcciones genéticas quedarán claros para el experto, y pueden depender, por ejemplo, del tipo de construcción usada; el organismo huésped o la célula huésped previsto; la manera en la que las secuencias de nucleótidos de la invención de interés van a expresarse (por ejemplo, por medio de expresión constitutiva, transitoria o inducible); y/o la técnica de transformación que va a usarse. Por ejemplo, pueden usarse secuencias reguladoras, promotores y terminadores conocidos *per se* para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de (un único) dominio y fragmentos ScFv) de una manera esencialmente análoga.

Preferiblemente, en las construcciones genéticas de la invención, dicho al menos un ácido nucleico de la invención y dichos elementos reguladores, y opcionalmente dichos uno o más elementos adicionales, están “operativamente unidos” entre sí, mediante lo cual quiere decirse que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor se considera “operativamente unido” a una secuencia codificante si dicho promotor es capaz de iniciar o controlar/regular de otra forma la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en el que dicha secuencia codificante debe entenderse que está “bajo el control de” dicho promotor). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótidos están operativamente unidas, estarán en la misma orientación y habitualmente también en el mismo marco de lectura. Habitualmente también serán esencialmente contiguas, aunque esto puede también no requerirse.

Preferiblemente, los elementos reguladores y adicionales de las construcciones genéticas de la invención son tales que son capaces de proporcionar su función biológica prevista en el organismo huésped o la célula huésped previsto.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser “operativo” en el organismo huésped o la célula huésped previsto, mediante lo cual quiere decirse que (por ejemplo) dicho promotor debe ser capaz de iniciar o controlar/regular de otra forma la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo una secuencia codificante, a la que está operativamente unido (tal como se define en el presente documento).

Algunos promotores particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotores conocidos *per se* para la expresión en las células huésped mencionadas en el presente documento; y en particular promotores para la expresión en las células bacterianas, tales como los mencionados en el presente documento y/o los usados en los ejemplos.

Un marcador de selección debe ser tal que permite, es decir en condiciones de selección apropiadas, que las células huésped y/u organismos huésped que se han transformado (satisfactoriamente) con la secuencia de nucleótidos de la invención se distinguen de organismos/células huésped que no se han transformado (satisfactoriamente). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales marcadores son genes que proporcionan resistencia frente a antibióticos (tales como kanamicina o ampicilina), genes que proporcionan resistencia a la temperatura, o genes que permiten que la célula huésped o el organismo huésped se mantenga en ausencia de determinados factores, compuestos y/o componentes (alimenticios) en el medio que son esenciales para la supervivencia de los organismos o las células no transformados.

Una secuencia líder debe ser tal que, en el organismo huésped o la célula huésped previsto, permite las modificaciones postraduccionales deseadas y/o tal que dirige el ARNm transcrito a un orgánulo o parte deseado de una célula. 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 preprosecuencia operativa en la célula huésped o el organismo huésped. Pueden no requerirse secuencias líder para la expresión en una célula bacteriana. Por ejemplo, pueden usarse secuencias líder conocidas *per se* para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de un único dominio y fragmentos ScFv) de una manera esencialmente análoga.

Un marcador de expresión o gen indicador debe ser tal que, en la célula huésped o el organismo huésped, permite la detección de la expresión de (un gen o secuencia de nucleótidos presente en) la construcción genética. Un marcador de expresión también puede opcionalmente permitir la localización del producto expresado, por ejemplo en un orgánulo o parte específico de una célula y/o en (una) célula(s), tejido(s), órgano(s) o parte(s) específico(s) de un organismo multicelular. Tales genes indicadores también pueden expresarse como una fusión de proteínas con la secuencia de aminoácidos, Nanobody® o polipéptido de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no

limitativos incluyen proteínas fluorescentes tales como GFP.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de promotores, terminadores y elementos adicionales adecuados incluyen los que pueden usarse para la expresión en las células huésped mencionadas en el presente documento; y en particular los que son adecuados para la expresión en células bacterianas, tales como los mencionados en el presente documento y/o los usados en los ejemplos a continuación. Para algunos ejemplos no limitativos (adicionales) de los promotores, marcadores de selección, secuencias líder, marcadores de expresión y elementos adicionales que pueden estar presentes/usarse en las construcciones genéticas de la invención, tales como terminadores, potenciadores de la 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 a los ejemplos que se facilitan 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-7.207.410, US-A-5.693.492 y EP 1 085 089. Otros ejemplos quedarán claros para el experto. Se hace también referencia a los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente y las referencias adicionales mencionadas en el presente documento.

Las construcciones genéticas de la invención pueden proporcionarse generalmente uniendo adecuadamente la(s) secuencia(s) de nucleótidos de la invención a uno o más elementos adicionales descritos anteriormente, por ejemplo usando las técnicas descritas en los manuales generales tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente.

A menudo, las construcciones genéticas de la invención se obtendrán insertando una secuencia de nucleótidos de la invención en un vector (de expresión) adecuado conocido *per se*. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de vectores de expresión adecuados son los usados en los ejemplos a continuación, así como los mencionados en el presente documento.

Los ácidos nucleicos de la invención y/o las construcciones genéticas de la invención pueden usarse para transformar una célula huésped o un organismo huésped, es decir, para la expresión y/o producción de la secuencia de aminoácidos, Nanobody® o polipéptido de la invención. Huéspedes o células huésped adecuados quedarán claros para el experto, y pueden ser por ejemplo cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado, por ejemplo:

- una cepa bacteriana, incluyendo pero sin limitarse a 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*;

- una célula fúngica, incluyendo pero sin limitarse a células de especies de *Trichoderma*, por ejemplo de *Trichoderma reesei*; de *Neurospora*, por ejemplo de *Neurospora crassa*; de *Sordaria*, por ejemplo de *Sordaria macrospora*; de *Aspergillus*, por ejemplo de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus sojae*; o de otros hongos filamentosos;

- una célula de levadura, incluyendo pero sin limitarse a células de especies de *Saccharomyces*, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*; de *Schizosaccharomyces*, por ejemplo de *Schizosaccharomyces pombe*; de *Pichia*, por ejemplo de *Pichia pastoris* o de *Pichia methanolica*; de *Hansenula*, por ejemplo de *Hansenula polymorpha*; de *Kluyveromyces*, por ejemplo de *Kluyveromyces lactis*; de *Arxula*, por ejemplo de *Arxula adenivorans*; de *Yarrowia*, por ejemplo de *Yarrowia lipolytica*;

- una línea celular o célula de anfibios, tal como *Xenopus oocytes*;

- una línea celular o célula derivada de insectos, tal como células/líneas celulares derivadas de lepidópteros, incluyendo pero sin limitarse a células de *Spodoptera* SF9 y Sf21 o células/líneas celulares derivadas de *Drosophila*, tales como células Schneider y Kc;

- una planta o célula vegetal, por ejemplo en plantas de tabaco; y/o

- una línea celular o célula de mamíferos, por ejemplo una línea celular o célula derivada de un humano, una célula o una línea celular de mamíferos incluyendo pero sin limitarse a células CHO, células BHK (por ejemplo, células BHK-21) y células o líneas celulares humanas tales como células HeLa, COS (por ejemplo, COS-7) y PER.C6;

así como todos los demás huéspedes o células huésped conocidos *per se* para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de (un único) dominio y fragmentos ScFv), que quedarán claros para el experto. Se hace también referencia a los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente en el presente documento, así como a, por ejemplo, los documentos WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken *et al.*, (1998), citado anteriormente; Riechmann y Muyldermans, (1999), citado anteriormente; van der Linden, (2000), citado anteriormente; Thomassen *et al.*, (2002), citado anteriormente; Joosten *et al.*, (2003), citado anteriormente; Joosten *et al.*, (2005), citado anteriormente; y las

referencias adicionales citadas en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y polipéptidos de la invención también pueden introducirse y expresarse en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo para fines profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como genoterapia). Para este fin, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden introducirse en las células o tejidos de cualquier modo adecuado, por ejemplo como tales (por ejemplo, usando liposomas) o tras haberse insertado en un vector de genoterapia adecuado (por ejemplo, derivado de retrovirus tales como adenovirus, o parvovirus tales como virus adenoasociado). Tal como quedará claro para el experto, tal genoterapia puede realizarse *in vivo* y/o *in situ* en el cuerpo de un paciente administrando un ácido nucleico de la invención o un vector de genoterapia adecuado que codifica el mismo al paciente o a células específicas o a un órgano o tejido específico del paciente; o células adecuadas (a menudo tomadas del cuerpo del paciente que va a tratarse, tales como linfocitos explantados, aspirados de médula ósea o biopsias de tejido) pueden tratarse *in vitro* con una secuencia de nucleótidos de la invención y luego (re)introducirse adecuadamente en el cuerpo del paciente. Todo esto puede realizarse usando vectores, técnicas y sistemas de administración de genoterapia que conoce bien el experto, y por ejemplo descritos en Culver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, Nueva York, N.Y.); Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91; (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documentos WO 94/29469; WO 97/00957, US 5.580.859; US 5.589.5466; o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Por ejemplo, se ha descrito en la técnica la expresión *in situ* de fragmentos ScFv (Afanasieva *et al.*, Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) y de diacuerpos (Blanco *et al.*, J. Immunol, 171, 1070-1077 (2003)).

Para la expresión de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos en una célula, también pueden expresarse como los denominados "intracuerpos", tal como se describe, por ejemplo, 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 y Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.

Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y polipéptidos de la invención también pueden producirse, por ejemplo, en la leche de mamíferos transgénicos, por ejemplo en la leche de conejos, vacas, cabras u ovejas (véanse por ejemplo los documentos US 6.741.957, US 6.304.489 y US 6.849.992 para técnicas generales para introducir transgenes en mamíferos), en plantas o partes de plantas incluyendo pero sin limitarse a sus hojas, flores, frutos, semillas, raíces o tubérculos (por ejemplo, en tabaco, maíz, soja o alfalfa) o en por ejemplo pupas del gusano de seda *Bombix mori*.

Además, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y polipéptidos de la invención también pueden expresarse y/o producirse en sistemas de expresión sin células, y ejemplos adecuados de tales sistemas quedarán claros para el experto. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos incluyen expresión en el sistema de germen de trigo; en lisados de reticulocitos de conejo; o en el sistema de *E. coli* de Zubay.

Tal como se mencionó anteriormente, una de las ventajas del uso de Nanobodies[®] es que los polipéptidos basados en los mismos pueden prepararse a través de expresión en un sistema bacteriano adecuado, y los sistemas de expresión, vectores, células huésped, elementos reguladores, etc. bacterianos adecuados, quedarán claros para el experto, por ejemplo a partir de las referencias citadas anteriormente. Sin embargo, debe indicarse que la invención en su sentido más amplio no se limita a la expresión en sistemas bacterianos.

Preferiblemente, 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 quedarán de nuevo claros para el experto. Tal como también quedará claro para el experto, pueden prepararse polipéptidos de la invención adecuados para uso farmacéutico usando técnicas para la síntesis de péptidos.

Para la producción a escala industrial, los huéspedes heterólogos preferidos para la producción (industrial) de compuestos terapéuticos proteicos que contienen Nanobodies[®] o Nanobody[®] incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* que son adecuadas para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para la expresión/producción/fermentación farmacéutica a gran escala. Los ejemplos adecuados de tales cepas quedarán claros para el experto. Tales cepas y sistemas de expresión/producción también están disponibles de empresas tales como Biovitrum (Uppsala, Suecia).

Alternativamente, pueden usarse líneas celulares de mamífero, en particular células de ovario de hámster chino (CHO), para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para la expresión/producción/fermentación farmacéutica a gran escala. De nuevo, tales sistemas de expresión/producción están también disponibles de algunas de las empresas mencionadas anteriormente.

La elección del sistema de expresión específico dependería en parte del requisito de determinadas modificaciones postraduccionales, más específicamente glucosilación. La producción de una proteína recombinante que contiene Nanobody[®] para la que se desea o requiere glucosilación necesitaría el uso de huéspedes de expresión de mamíferos que tienen la capacidad de glucosilar la proteína expresada. En este sentido, quedará claro para el experto que el patrón de glucosilación obtenido (es decir, la clase, el número y la posición de residuos unidos) dependerá de la célula o línea celular que se usa para la expresión. Preferiblemente, se usa o bien una célula o bien una línea celular humana (es decir, conduciendo a una proteína que tiene esencialmente un patrón de glucosilación humano) u otra línea celular de mamíferos que puede proporcionar un patrón de glucosilación que es esencialmente y/o funcionalmente el mismo que la glucosilación humana o al menos imita la glucosilación humana. Generalmente, huéspedes procariotas tales como *E. coli* no tienen la capacidad de glucosilar proteínas, y el uso de eucariotas inferiores tales como levaduras conduce habitualmente a un patrón de glucosilación que difiere de la glucosilación humana. No obstante, debe entenderse que todas las células huésped y sistemas de expresión anteriores pueden usarse en la invención, dependiendo de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido deseado que va a obtenerse.

Por tanto, según una realización no limitativa de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención está glucosilado. Según otra realización no limitativa de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención no está glucosilado.

Según una realización preferida, pero no limitativa de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención se produce en una célula bacteriana, en particular una célula bacteriana adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como células de las cepas mencionadas anteriormente.

Según otra realización preferida, pero no limitativa de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención se produce en una célula de levadura, en particular una célula de levadura adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como células de las especies mencionadas anteriormente.

Según aún otra realización preferida, pero no limitativa de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] 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 a gran escala, tal como las líneas celulares mencionadas anteriormente en el presente documento.

Cuando se usa la expresión en una célula huésped para producir las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y los polipéptidos de la invención, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y polipéptidos de la invención pueden producirse o bien intracelularmente (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma o en cuerpos de inclusión) y luego aislarse de las células huésped y opcionalmente purificarse adicionalmente; o pueden producirse extracelularmente (por ejemplo, en el medio en el que se cultivan las células huésped) y luego aislarse del medio de cultivo y opcionalmente purificarse adicionalmente. Cuando se usan células huésped eucariotas, se prefiere habitualmente la producción extracelular puesto que esto facilita considerablemente el aislamiento y procesamiento posterior adicionales de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y proteínas obtenidos. Células bacterianas tales como las cepas de *E. coli* mencionadas anteriormente no secretan normalmente proteínas de manera extracelular, excepto unas pocas clases de proteínas tales como toxinas y hemolisina, y producción secretora en *E. coli* se refiere a la translocación de proteínas a través de la membrana interna al espacio periplásmico. La producción periplásmica proporciona varias ventajas con respecto a la producción citosólica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos N-terminal del producto secretado puede ser idéntica al producto génico natural tras la escisión de la secuencia señal de secreción por una peptidasa de señal específica. Además, parece haber mucha menos actividad proteínasa en el periplasma que en el citoplasma. Además, la purificación de proteínas es más sencilla debido a una menor contaminación de proteínas en el periplasma. Otra ventaja es que pueden formarse puentes de disulfuro correctos porque el periplasma proporciona un entorno más oxidativo que el citoplasma. Las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* se encuentran a menudo en agregados insolubles, los denominados cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión pueden estar ubicados en el citosol o en el periplasma; la recuperación de proteínas biológicamente activas de estos cuerpos de inclusión requiere un proceso de desnaturalización/replegamiento. Muchas proteínas recombinantes, incluyendo proteínas terapéuticas, se recuperan de cuerpos de inclusión. Alternativamente, tal como quedará claro para el experto, pueden usarse cepas recombinantes de bacterias que se han modificado genéticamente para segregar una proteína deseada, y en particular una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o un polipéptido de la invención.

Por tanto, según una realización no limitativa de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención es una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido que se ha producido intracelularmente 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. Según otra realización no limitativa de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención es una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido que se ha producido extracelularmente, y que se ha aislado del medio en el que se cultiva la célula huésped.

Algunos promotores preferidos, pero no limitativos para su uso con estas células huésped incluyen,

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

- para la expresión en *S. cerevisiae*: constitutiva: ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), ENO (enolasa), CYC1 (citocromo c iso-1), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), PGK1 (fosfoglicerato cinasa), PYK1 (piruvato cinasa); regulada: GAL1.10.7 (enzimas metabólicas de galactosa), ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2), PHO5 (fosfatasa ácida), CUP1 (metalotioneína de cobre); heteróloga: CaMV (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor);

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

- para la expresión en células de mamífero: promotor/potenciador temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV); variante de promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV) que contiene dos secuencias de operador de tetraciclina de manera que el promotor puede regularse mediante el represor Tet; promotor de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple; promotor/potenciador de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (VRS LTR); promotor de factor de elongación 1 α (hEF-1 α) de humano, chimpancé, ratón o rata; el promotor temprano de SV40; promotor de la repetición terminal larga de VIH-1; promotor de β -actina.

Algunos vectores preferidos, pero no limitativos para su uso con estas células huésped incluyen:

- vectores para la expresión en células de mamífero: pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC37199), pRSVneo (ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565), así como sistemas de expresión basados en virus, tales como los basados en adenovirus;

- vectores para la expresión en células bacterianas: vectores pET (Novagen) y vectores pQE (Qiagen);

- vectores para la expresión en levadura u otras células fúngicas: pYES2 (Invitrogen) y vectores de expresión de *Pichia* (Invitrogen);

- vectores para la expresión en células de insecto: pBlueBacII (Invitrogen) y otros vectores de baculovirus

- vectores para la expresión en plantas o células vegetales: por ejemplo vectores basados en virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco, cepas adecuadas de *Agrobacterium*, o vectores basados en plásmido Ti.

Algunas secuencias secretoras preferidas, pero no limitativas para su uso con estas células huésped incluyen:

- para su uso en células bacterianas tales como *E. coli*: PelB, Bla, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, Stil, PhoA, PhoE, MalE, Lpp, LamB, y similares; péptido señal TAT, señal de secreción C-terminal de hemolisina;

- para su uso en levaduras: prepro-secuencia de factor de apareamiento α , fosfatasa (pho1), invertasa (Suc), etc.;

- para su uso en células de mamífero: señal endógena en el caso de que la proteína diana sea de origen eucariota; péptido señal V-J2-C de cadena κ de Ig murina; etc.

Las técnicas adecuadas para transformar un huésped o una célula huésped de la invención quedarán claras para el experto y pueden depender de la célula huésped/organismo huésped previsto y la construcción genética que va a usarse. Se hace referencia de nuevo a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente.

Tras la transformación, puede realizarse una etapa para detectar y seleccionar las células huésped o los organismos huésped que se han transformado satisfactoriamente con la secuencia de nucleótidos/construcción genética de la invención. Esta puede ser por ejemplo una etapa de selección basada en un marcador seleccionable presente en la construcción genética de la invención o una etapa que implica la detección de la secuencia de aminoácidos de la invención, por ejemplo usando anticuerpos específicos.

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

Preferiblemente, estas células huésped u organismos huésped son tales que expresan, o (al menos) son capaces de expresar (por ejemplo, en condiciones adecuadas), una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la

invención (y en el caso de un organismo huésped: en al menos una célula, parte, tejido u órgano del mismo). La invención también incluye generaciones, progenie y/o descendencia adicional de la célula huésped o el organismo huésped de la invención, que puede obtenerse, por ejemplo, mediante división sexual o mediante reproducción sexual o asexual.

5 Para producir/obtener la expresión de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] o polipéptidos de la invención, la célula huésped transformada o el organismo huésped transformado puede conservarse, mantenerse y/o cultivarse en condiciones tales que se expresa/produce la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido (deseado) de la invención. Las condiciones adecuadas quedarán claras para el experto y dependerán habitualmente de la célula huésped/organismo huésped usado, así como de los elementos reguladores que controlan la expresión de la
10 secuencia de nucleótidos (relevante) de la invención. De nuevo, se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente en los párrafos sobre las construcciones genéticas de la invención.

15 Generalmente, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada, y opcionalmente la presencia de un compuesto o factor de inducción adecuado (por ejemplo, cuando las secuencias de nucleótidos de la invención están bajo el control de un promotor inducible); todo lo cual puede seleccionarlo el experto. De nuevo, en tales condiciones, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden expresarse de una manera constitutiva, de una manera transitoria o solo cuando se inducen adecuadamente.

20 También quedará claro para el experto que la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención puede generarse (en primer lugar) en una forma inmadura (tal como se mencionó anteriormente), que entonces puede someterse a modificación postraduccional, dependiendo de la célula huésped/organismo huésped usado. Además, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención puede glucosilarse, dependiendo de
25 nuevo de la célula huésped/organismo huésped usado.

La secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención puede entonces aislarse de la célula huésped/organismo huésped y/o del medio en el que dicha célula huésped u organismo huésped se cultivó, usando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas *per se*, tales como técnicas de cromatografía y/o
30 electroforesis (preparativa), técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo, usando una secuencia de aminoácidos específica, escindible fusionada con la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir, usando anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos que va a aislarse).

35 La invención se refiere además a un producto o una composición que contiene o que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la invención (o un fragmento adecuado de la misma), al menos un Nanobody[®] de la invención, al menos un polipéptido de la invención, al menos un compuesto o construcción de la invención, al menos una construcción monovalente de la invención y/o al menos un ácido nucleico de la invención, y opcionalmente uno o más componentes adicionales de tales composiciones conocidos *per se*, es decir dependiendo del uso previsto de
40 la composición. Un producto o una composición de este tipo puede ser, por ejemplo, una composición farmacéutica (tal como se describe en el presente documento), una composición veterinaria o un producto o una composición para uso de diagnóstico (tal como se describe también en el presente documento). Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de tales productos o composiciones quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

45 Generalmente, para uso farmacéutico, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y polipéptidos de la invención pueden formularse como una preparación farmacéutica o composiciones que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Por medio de ejemplos no limitativos, una formulación de este tipo puede estar en una forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa), para administración tópica, para administración mediante inhalación, mediante un parche cutáneo, mediante un implante, mediante un supositorio, etc. Tales formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la manera de
50 administración, así como los métodos y portadores para su uso en la preparación de las mismas, quedarán claros para el experto, y se describen adicionalmente en el presente documento.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un aminoácido de la invención, al menos un Nanobody[®] de la invención, al menos un compuesto o construcción de la invención o al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para uso farmacéutico), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

60 Generalmente, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier manera conocida *per se*, para lo cual se hace referencia por ejemplo, a los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente (y en particular a los documentos WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 y WO 08/020079) así como a los
65

manuales convencionales, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., Mack Publishing Company, EE. UU. (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21.^a edición, Lippincott Williams y Wilkins (2005); o the Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (véanse por ejemplo las páginas 252-255).

5 Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier manera conocida *per se* para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos convencionales (incluyendo ScFv y diacuerpos) y otras proteínas farmacéuticamente activas. Tales formulaciones y métodos para preparar las mismas quedarán claros para el experto, y por ejemplo incluyen preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intraarterial o intratecal) o para administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

15 Las preparaciones para administración parenteral pueden ser, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que son adecuadas para infusión o inyección. Los portadores o diluyentes adecuados para tales preparaciones incluyen por ejemplo, sin limitación, los mencionados en la página 143 del documento WO 08/020079. Habitualmente, se preferirán disoluciones o suspensiones acuosas.

20 Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención también pueden administrarse usando métodos de administración de genoterapia. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.399.346, que se incorpora como referencia en su totalidad. Usando un método de administración de genoterapia, células primarias transfectadas con el gen que codifica una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención pueden transfectarse adicionalmente con promotores específicos de tejido para seleccionar como diana órganos, tejido, injertos, tumores o células específicos y pueden transfectarse adicionalmente con secuencias señal y de estabilización para expresión localizada subcelularmente.

30 Por tanto, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención pueden administrarse de manera sistémica, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina duras o blandas, o pueden comprimirse para dar comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención pueden combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparados deben contener al menos el 0,1% de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto, construcción o polipéptido de la invención. Su porcentaje en las composiciones y preparados, por supuesto, puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 a aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto, construcción o polipéptido de la invención en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

40 Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares pueden contener también aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes y agentes edulcorantes o aromatizantes, por ejemplo, los mencionados en las páginas 143-144 del documento WO 08/020079. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otra forma la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, pueden recubrirse comprimidos, píldoras o cápsulas con gelatina, cera, laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención pueden incorporarse en dispositivos y preparados de liberación lenta.

55 Los preparados y formulaciones para administración oral también pueden proporcionarse con un recubrimiento entérico que permitirá que las construcciones de la invención resistan el entorno gástrico y pasen al interior de los intestinos. Más generalmente, pueden formularse adecuadamente preparados y formulaciones para administración oral para su administración a cualquier parte deseada del tubo gastrointestinal. Además, pueden usarse supositorios adecuados para su administración al tubo gastrointestinal.

60 Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención también pueden administrarse por vía intravenosa o por vía intraperitoneal mediante infusión o inyección, tal como se describe adicionalmente en las páginas 144 y 145 del documento WO 08/020079.

65 Para administración tópica, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención pueden aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, será

deseable generalmente administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido, tal como se describe adicionalmente en la página 145 del documento WO 08/020079.

5 Generalmente, la concentración de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de desde aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-2,5% en peso.

10 En un aspecto preferido, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos se administran al tejido pulmonar. En el contexto de la presente invención, "tejido pulmonar" es para los fines de esta invención equivalente a tejido de pulmón o pulmón. El pulmón comprende 2 zonas distintas: una zona de conducción y una respiratoria, dentro de la que se encuentran las vías respiratorias y los compartimentos vasculares (véase por ejemplo "Pulmonary Drug Delivery", editado por Karoline Bechtold-Peters y Henrik Luessen, 2007, ISBN 978-3-87193-322-6 páginas 16-28).

15 Para administración pulmonar, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención pueden aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos o un polvo seco. Sin embargo, se preferirá administrarlos al tejido pulmonar como una composición o formulación que comprende una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto, construcción y/o polipéptido de la invención y un portador adecuado para administración pulmonar. Por consiguiente la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto, construcción y/o polipéptido de la invención y un portador adecuado para administración pulmonar. Se conocen en la técnica portadores adecuados para administración pulmonar.

20 Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención también pueden administrarse como micro- o nanopartículas de fármacos puros con tamaños de partícula y distribuciones favorables para administración pulmonar.

25 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un dispositivo farmacéutico adecuado para la administración pulmonar de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención y adecuado en el uso de una composición que comprende los mismos. Este dispositivo puede ser un inhalador para líquidos (por ejemplo, una suspensión de gotitas o partículas sólidas finas) que comprende la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto, construcciones y/o polipéptido de la invención. Preferiblemente este dispositivo es un aerosol que comprende la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto, construcción y/o polipéptido de la invención. El dispositivo puede ser también un inhalador de polvo seco que comprende la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto, construcción y/o polipéptido de la invención en forma de un polvo seco.

30 En un método preferido, la administración al tejido pulmonar se realiza inhalando las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención y/o la composición que comprende los mismos en una nube de aerosol. Según la invención, la inhalación de la nube de aerosol puede realizarse mediante un dispositivo inhalador. El dispositivo debe generar a partir de una formulación que comprende las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención (y/o composición que comprende los mismos) una nube de aerosol del tamaño (distribución) de partícula deseado en el momento apropiado del ciclo de inhalación del mamífero, que contiene la dosis correcta de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención ("Pulmonary drug delivery", Bechtold-Peters y Luessen, eds., ISBN 978-3-87193-322-6, página 125).

35 En el contexto de la presente invención, "aerosol" indica una suspensión de partículas sólidas finas o gotitas líquidas (o combinación de las mismas) en un gas en el que para los fines de esta invención las partículas y/o gotitas comprenden las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención.

40 El dispositivo debe generar a partir de la formulación una nube de aerosol del tamaño (distribución) de partícula deseado en el momento apropiado del ciclo de inhalación del mamífero, que contiene la dosis correcta de secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención. Deben considerarse los siguientes 4 requisitos (formulación, tamaño de partícula, tiempo y dosis) ("Pulmonary Drug Delivery", Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente, páginas 125 y 126):

45 - las formulaciones que se usan en los dispositivos pueden variar de disoluciones o suspensiones acuosas usadas en nebulizadores a las disoluciones o suspensiones a base de propelente usadas en inhalador de dosis medida o incluso mezclas de polvo especialmente diseñadas por ingeniería para los inhaladores de polvo seco. Todas estas diferentes formulaciones requieren diferentes principios para la generación del aerosol, lo que enfatiza la dependencia mutua del dispositivo y la formulación;

- puesto que el sitio de deposición de partículas de aerosol depende de su tamaño (aerodinámico) y velocidad, el tamaño de partícula deseado de la nube de aerosol varía dependiendo del sitio de deposición deseado en el pulmón, lo que se refiere al objetivo terapéutico de la administración;

5 - puesto que la nube de aerosol puede ajustarse para que se libere a diferentes momentos durante el ciclo de inhalación generado por el mamífero, se prefiere que para los agentes de la invención (que van a depositarse en las partes periféricas del pulmón) el aerosol se libere al comienzo del ciclo de inhalación;

10 - las dosis pueden variar considerablemente y, por ejemplo, pueden variar, por ejemplo, para un humano desde unos pocos microgramos hasta varios cientos de microgramos o incluso miligramos, por ejemplo aproximadamente hasta aproximadamente de 10 a 100 miligramos.

15 Se describen por ejemplo diversos sistemas de inhalación en las páginas 129 a 148 en la revisión ("Pulmonary Drug Delivery", Bechtold-Peters y Lessen, eds., citado anteriormente) e incluyen, pero no se limitan a, nebulizadores, inhaladores de dosis medida, inhaladores de líquidos de dosis medida e inhaladores de polvo seco. También pueden usarse dispositivos que tienen en cuenta el patrón de respiración optimizado e individualizado para maniobras de inhalación controlada (véase la tecnología AKITA[®] en la página 157 de "Pulmonary Drug Delivery", Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente).

20 Sin embargo, no sólo el dispositivo es importante para la administración pulmonar de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención sino que también la formulación correcta es crítica para lograr una administración eficaz. Esto puede lograrse en principio usando uno de los siguientes enfoques:

25 - administración de disoluciones o suspensiones acuosas que comprenden las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención (por ejemplo, gotas nasales) dentro de las cavidades nasales;

30 - nebulización de disoluciones o suspensiones acuosas que comprenden las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención;

- atomización por medio de propelentes licuados; y

35 - dispersión de polvos secos.

40 Por tanto las formulaciones de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención tienen que adaptarse y ajustarse al dispositivo de inhalación elegido. Se describen por ejemplo formulaciones apropiadas, es decir, los excipientes además de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y/o polipéptidos de la invención, en el capítulo IV de "Pulmonary Drug Delivery", Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente. En este sentido, se hace también referencia a la solicitud provisional de EE. UU. n.º US 61/303.447, prioridad del documento WO2011/098552.

45 La cantidad de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención requerida para su uso en el tratamiento variará no sólo con la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuestos, construcciones o polipéptido particular seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose y la edad y estado del paciente y en última instancia estará a juicio del médico o doctor encargado. También la dosificación de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos, construcciones y polipéptidos de la invención varía dependiendo de la célula huésped diana, tumor, tejido, injerto u órgano.

50 La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una única dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis puede dividirse además, por ejemplo, en varias administraciones separadas libremente diferenciadas; tales como múltiples inhalaciones a partir de un insuflador o mediante aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

55 Un régimen de administración podría incluir tratamiento a largo plazo, diario. Por "largo plazo" quiere decirse al menos dos semanas y preferiblemente, varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación puede determinarlas un experto habitual en la técnica usando sólo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ajustarla el médico individual en el caso de cualquier complicación.

60 La invención se refiere además a aplicaciones y usos de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento, así como a métodos para la prevención y/o el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias provocadas por VRSh.

Algunas aplicaciones y usos preferidos pero no limitativos quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención pueden usarse generalmente para bloquear la interacción de proteína F de VRSh con la célula huésped diana y/o su membrana, para neutralizar VRSh (diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh), para modular, inhibir y/o prevenir la infectividad de VRSh (de diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh), para modular, inhibir y/o prevenir la fusión (de diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh) con (la membrana celular de) la célula huésped diana y/o para modular, inhibir y/o prevenir la entrada de VRSh en la célula huésped diana (de diferentes cepas y/o mutantes de escape de VRSh).

En un aspecto, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención pueden bloquear la interacción de proteína F de VRSh con la célula huésped diana y/o su membrana en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o el 90% o más, en comparación con la interacción de proteína F de VRSh con la célula huésped diana y/o su membrana en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, medido de cualquier manera conocida *per se*, por ejemplo usando uno de los ensayos descritos en el presente documento.

En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención neutralizan la infectividad de VRSh en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o el 90% o más, en comparación con la neutralización de VRSh en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, medido de cualquier manera adecuada conocida *per se*, por ejemplo usando uno de los ensayos descritos en el presente documento.

En el contexto de la presente invención, “modulación” o “modular” significa generalmente o bien reducir, prevenir o inhibir la infectividad vírica, fusión y/o entrada vírica y/o reducir, prevenir o inhibir las rutas biológicas que están mediadas por la proteína F de VRSh, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento). En particular, “modulación” o “modular” puede significar o bien reducir, prevenir o bien inhibir la infectividad vírica, fusión y/o entrada vírica y/o reducir, prevenir o inhibir las rutas biológicas que están mediadas por la proteína F de VRSh tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento), en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o el 90% o más, en comparación con la infectividad vírica, fusión y/o entrada vírica normal (es decir, que se produce de manera natural) y/o las rutas biológicas normales (es decir, que se producen de manera natural) que están mediadas por la proteína F de VRSh en el mismo ensayo en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención.

En un aspecto, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención pueden modular, inhibir y/o prevenir la infectividad de VRSh en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o el 90% o más, en comparación con la infectividad en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, medido de cualquier manera conocida *per se*, por ejemplo usando uno de los ensayos descritos en el presente documento.

El término “entrada vírica” usado en el presente documento abarca cualquier ruta biológica mediada por virus que es necesaria para lograr la unión del virión a una célula huésped diana y/o la fusión vírica con una célula huésped diana. Se abarca en la presente invención que la entrada vírica, que puede ser cualquier ruta biológica mediada por virus que es necesaria para lograr la unión del virión a una célula huésped diana y/o la fusión vírica con una célula huésped diana, puede modularse y/o reducirse y/o prevenirse y/o inhibirse mediante la unión específica de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y/o compuestos de la invención, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento). En particular, la entrada vírica, que puede estar mediada por la proteína F de VRSh, puede modularse, reducirse, prevenirse o inhibirse mediante la unión específica de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y/o compuestos de la invención a la proteína F de VRSh, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento), en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o el 90% o más, en comparación con la entrada vírica normal (es decir, que se produce de manera natural) (tal como se define en el presente documento), que puede estar mediada por la proteína F de VRSh, en el mismo ensayo en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], polipéptido y/o compuesto de la invención. Por tanto, también se abarca que la unión vírica y/o fusión vírica pueda modularse y/o reducirse y/o prevenirse y/o inhibirse mediante la unión específica de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y/o compuestos de la invención a la proteína F de VRSh, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento). En particular, la unión vírica y/o fusión vírica, que pueden estar mediadas por la proteína F de VRSh, pueden modularse, reducirse,

prevenirse o inhibirse mediante la unión específica de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos y/o compuestos de la invención a la proteína F de VRSh, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento), en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o el 90% o más, en comparación con la unión vírica y/o fusión vírica normal (es decir, que se produce de manera natural), que pueden estar mediadas por proteína F de VRSh en el mismo ensayo en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], polipéptido y/o compuesto de la invención.

En este sentido, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención pueden modular, inhibir y/o prevenir la entrada de VRSh en la célula huésped diana en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o el 90% o más, en comparación con la entrada en la célula huésped diana en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, por ejemplo usando uno de los ensayos descritos en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención también pueden modular, inhibir y/o prevenir la fusión de VRSh con (la membrana celular de) la célula huésped diana en al menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, tal como al menos el 10% o al menos el 25%, por ejemplo en al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o el 90% o más, en comparación con la fusión de VRSh con (la membrana celular de) la célula huésped diana en las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®] o polipéptido de la invención, medido de cualquier manera adecuada conocida *per se*, por ejemplo usando uno de los ensayos descritos en el presente documento.

Los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) de la invención han mostrado afinidad mejorada y/o reactividad cruzada mejorada por diferentes genotipos, subtipos, mutantes de escape víricos y/o cepas de VRSh en comparación con la secuencia de aminoácidos monovalente o Nanobody[®]. En un aspecto, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) de la invención pueden unirse a diferentes cepas de VRS (tal como, por ejemplo, Long, A-2 y/o B-1). En aún otro aspecto, los polipéptidos multivalentes (tales como bivalentes o trivalentes) de la invención pueden unirse a diferentes mutantes de escape de VRSh (tal como se describe, por ejemplo, en Lopez *et al.* 1998, J. Virol. 72: 6922-6928) y/o mutantes de escape específicos para el sitio antigénico II, sitio antigénico IV-VI o la combinación de ambos sitios antigénicos.

Por consiguiente, la invención también se refiere al uso de un polipéptido multivalente (por ejemplo, trivalente, bivalente) de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo para la unión y/o neutralización de diferentes cepas de un VRSh. En un aspecto preferido, se usa un Nanobody[®] NC41 humanizado y/o de secuencia optimizada bivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido bivalente que comprende dos Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157). En otro aspecto preferido, se usa un Nanobody[®] NC41 humanizado y/o de secuencia optimizada trivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido trivalente que comprende tres Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157). En otro aspecto preferido, se usa una de SEQ ID NO: 77-79, 142-145 y 158-165.

La invención también se refiere al uso de un polipéptido multivalente (por ejemplo, trivalente, bivalente) de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo para la unión y/o neutralización de uno o más mutantes de escape de un VRSh. En un aspecto preferido, se usa un Nanobody[®] NC41 humanizado bivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido bivalente que comprende dos Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157). En otro aspecto preferido, se usa un Nanobody[®] NC41 humanizado trivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido trivalente que comprende tres Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 64-76, 138-141 y 146-157). En otro aspecto preferido, se usa una de SEQ ID NO: 77-79, 142-145 y 158-165.

La invención también se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad vírica, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un Nanobody[®] de la invención, de un polipéptido de la invención, de un compuesto o construcción de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

Como tales, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos y composiciones de la presente invención pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con infección por VRSh. Los ejemplos de tales enfermedades y trastornos asociados con infección por VRSh quedarán claros para el experto basándose en la divulgación en el presente documento, y por ejemplo incluyen las siguientes enfermedades y trastornos: enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y asma.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis

(inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y/o asma provocados por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de aminoácidos de la invención, Nanobody[®] de la invención, polipéptido de la invención, compuesto o construcción de la invención o construcción monovalente de la invención, o una composición de la invención.

La invención también se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos de la invención, un Nanobody[®] de la invención, un polipéptido de la invención, un compuesto o construcción de la invención o construcción monovalente de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y/o asma; y/o para su uso en uno o más de los métodos descritos en el presente documento.

La invención también se refiere a una secuencia de aminoácidos de la invención, un Nanobody[®] de la invención, un polipéptido de la invención, un compuesto o construcción de la invención o construcción monovalente de la invención para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y/o asma.

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

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

Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido multivalente (por ejemplo, trivalente o bivalente) o compuesto de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo. Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto o polipéptido bivalente de la invención. Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody[®] NC41 humanizado y/o de secuencia optimizada bivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido bivalente que comprende dos Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157). Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto o polipéptido trivalente de la invención. Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody[®] NC41 humanizado trivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido trivalente que comprende tres Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157). Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una de SEQ ID NO: 77-79, 142-145 y 158-165.

Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un Nanobody[®] de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, método que comprende administrar, a un sujeto que padece o corre el riesgo de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un Nanobody[®] de la invención, de un polipéptido de la invención, de un compuesto o construcción de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

En los métodos anteriores, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y/o

polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos pueden administrarse de cualquier manera adecuada, dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica que va a usarse. Por tanto, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®] y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos pueden administrarse por ejemplo por vía oral, por vía intraperitoneal (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía transcutánea, por vía intramuscular, o por medio de cualquier otra vía de administración que evita el tubo gastrointestinal), por vía intranasal, por vía transdérmica, por vía tópica, por medio de un supositorio, mediante inhalación, de nuevo dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica que va a usarse. El médico podrá seleccionar una vía de administración adecuada y una formulación o composición farmacéutica adecuada que va a usarse en tal administración, dependiendo de la enfermedad o trastorno que va a prevenirse o tratarse y otros factores bien conocidos por el médico.

Por tanto, en general, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y polipéptidos según la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos pueden administrarse de cualquier manera adecuada; por ejemplo pero sin limitarse a ello, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y polipéptidos según la invención y las composiciones que comprenden los mismos pueden administrarse por vía intranasal y/o mediante inhalación y/o mediante cualquier otra forma adecuada de administración pulmonar; los métodos para administración pulmonar y/o administración intranasal y/o administración mediante inhalación de un Nanobody[®], secuencia de aminoácidos, compuesto o construcción y/o polipéptido de la invención los conocerá el experto y se describen por ejemplo en el manual "Drug Delivery: Principles and Applications" (2005) de Binghe Wang, Teruna Siahaan y Richard Soltero (Eds. Wiley Interscience (John Wiley & Sons)); en la solicitud internacional WO 08/049897 de Ablynx N.V. titulada "Administración intranasal de polipéptidos y proteínas"; en "Pharmacology PreTest™ Self-Assessment and Review" (11.ª edición) de Rosenfeld G.C., Loose-Mitchell D.S.; y en "Pharmacology" (3.ª edición) de Lippincott Williams & Wilkins, Nueva York; Schlafer M. McGraw-Hill Medical Publishing Division, Nueva York; Yang K.Y., Graff L.R., Caughey A.B. Blueprints Pharmacology, Blackwell Publishing.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para administrar una cantidad eficaz de una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido de la invención y/o una composición que comprende los mismos, en el que dicho método comprende la etapa de administrar la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido y/o composición que comprende los mismos al tejido pulmonar. En tal método, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido y/o una composición que comprende los mismos pueden administrarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la administración pulmonar tal como, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o dispositivo de administración intranasal o aerosol.

En un aspecto preferido de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido se unirán y/o neutralizarán el virus presente en el tejido pulmonar. Preferiblemente en tal método para administración pulmonar al menos el 5%, preferiblemente al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, el 60%, el 70%, e incluso más preferiblemente al menos el 80% o más de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido de la invención es estable en el tejido pulmonar durante al menos 24 horas, preferiblemente al menos 48 horas, más preferiblemente al menos 72 horas.

Se ha encontrado sorprendentemente que las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y/o polipéptidos de la invención tienen una estabilidad de larga duración en el tejido pulmonar. Por ejemplo, se ha encontrado que un Nanobody[®] dirigido contra VRSh sigue siendo funcional en el pulmón durante al menos 48 horas (véase el documento WO 2009/147248). Por tanto, se cree que son posibles realizaciones de la invención con intervalos de tratamiento tales como una vez al día, una vez cada 2.º, 3.º, 4.º, 5.º, 6.º o una vez a la semana tomando la estabilidad de larga duración estimada de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y/o polipéptidos de la invención.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método para administrar una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido de la invención al tejido pulmonar de un sujeto sin inactivarse, comprendiendo dicho método la etapa de administración pulmonar de dicha secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido de la invención a dicho sujeto.

La invención también se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un Nanobody[®] de la invención, de un polipéptido de la invención, de un compuesto o construcción de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

Más en particular, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y/o asma, comprendiendo dicho método administrar, al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad

farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un Nanobody[®] de la invención, de un polipéptido de la invención, de un compuesto o construcción de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

5 Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido multivalente (por ejemplo, trivalente, bivalente) o compuesto de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo. Más en particular, la presente
10 invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto o polipéptido bivalente de la invención. Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody[®] NC41 humanizado bivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido bivalente que comprende dos Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157). Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto o polipéptido trivalente de la invención. Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un Nanobody[®] NC41 humanizado trivalente (tal como, por ejemplo, un polipéptido trivalente que comprende tres Nanobodies[®] seleccionados de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157). Más en particular, la presente invención puede referirse a un método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una de SEQ ID NO: 77-79, 142-145 y 158-165.

25 También por ejemplo pero sin limitarse a ello, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones, y polipéptidos según la invención y composiciones que comprenden los mismos, pueden administrarse por vía intramuscular y/o mediante cualquier forma adecuada de administración al cerebro, tal como cualquier forma adecuada de administración que permite que dichas secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, compuestos o construcciones y composiciones que comprenden los mismos se transporten a través de la barrera hematoencefálica. Tales métodos para administración intramuscular y/o cualquier forma adecuada de administración al cerebro de un Nanobody[®], secuencia de aminoácidos y/o polipéptido de la invención los conocerá el experto y se describen por ejemplo en el manual "Drug Delivery: Principles and Applications" (2005) de Binghe Wang, Teruna Siahaan y Richard Soltero (Eds. Wiley Interscience (John Wiley & Sons)); en "Pharmacology PreTest[™] Self-Assessment and Review" (11.^a edición) de Rosenfeld G.C., Loose-Mitchell D.S.; y en "Pharmacology" (3.^a edición) de Lippincott Williams & Wilkins, Nueva York; Schlafer M. McGraw-Hill Medical Publishing Division, Nueva York; Yang K.Y., Graff L.R., Caughey A.B. Blueprints Pharmacology, Blackwell Publishing.

40 Las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos se administran según un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno que va a prevenirse o tratarse. El médico será capaz generalmente de determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o trastorno que va a prevenirse o tratarse, la gravedad de la enfermedad que va a tratarse y/o la gravedad de los síntomas de la misma, la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción o polipéptido específico de la invención
45 que va a usarse, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica que va a usarse, la edad, el género, el peso, la dieta, el estado general del paciente, y factores similares bien conocidos por el médico.

50 Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y/o polipéptidos de la invención, o de una o más composiciones que comprenden los mismos, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente eficaces. La(s) cantidad(es) específica(s) o dosis que van a administrarse puede determinarlas el médico, de nuevo basándose en los factores mencionados anteriormente.

55 Generalmente, para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos mencionados en el presente documento y dependiendo de la enfermedad o el trastorno específico que va a tratarse, la potencia de la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción o polipéptido específico de la invención que va a usarse, la vía específica de administración y la formulación o composición farmacéutica específica usada, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y polipéptidos de la invención se administrarán generalmente en una cantidad de entre 1 gramo y 1 microgramo por kg de peso corporal al día, preferiblemente entre 0,1 gramos y 10 microgramos por kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente entre 0,01 gramos y 100 microgramos por kg de peso corporal al día tal como aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 5 o 10 miligramos por kg de peso corporal al día, o bien de manera continua (por ejemplo, mediante infusión), como una única dosis diaria o como múltiples dosis divididas durante el día. Pueden administrarse secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y polipéptidos de la invención que contienen un resto que prolonga la semivida en una cantidad de entre 1 miligramo y 100 miligramos por kg de peso corporal, preferiblemente entre 1 miligramo y 50 miligramos por kg de peso corporal, tal como aproximadamente 10, 15, 20 o 30 miligramos por kg

- de peso corporal una o dos veces al mes. El médico será capaz generalmente de determinar una dosis diaria adecuada, dependiendo de los factores mencionados en el presente documento. También quedará claro que en casos específicos, el médico puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo basándose en los factores mencionados anteriormente y su juicio experto. Generalmente, puede obtenerse algo de orientación sobre las cantidades que van a administrarse a partir de las cantidades habitualmente administradas para anticuerpos o fragmentos de anticuerpo convencionales comparables contra la misma diana administrados por medio de esencialmente la misma vía, teniendo en cuenta sin embargo diferencias en afinidad/avidez, eficacia, biodistribución, semivida y factores similares bien conocidos por el experto.
- 5
- 10 Cuando se administra la secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción y/o polipéptido y/o una composición que comprende el mismo al tejido pulmonar, el régimen de tratamiento puede ser de una vez o dos veces al día, preferiblemente una vez al día, o una vez cada 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días.
- 15 Habitualmente, en el método anterior, se usará una única secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción o polipéptido de la invención. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención usar dos o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y/o polipéptidos de la invención en combinación.
- 20 Los Nanobodies[®], secuencias de aminoácidos, compuestos o construcciones y polipéptidos de la invención también pueden usarse en combinación con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como un régimen de tratamiento combinado, que puede conducir o no a un efecto sinérgico. De nuevo, el médico será capaz de seleccionar tales compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basándose en los factores mencionados anteriormente y su juicio experto.
- 25 En particular, las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones y polipéptidos de la invención pueden usarse en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos que son o pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, como resultado de lo cual puede obtenerse o no un efecto sinérgico. Los ejemplos de tales compuestos y principios, así como vías, métodos y formulaciones o composiciones farmacéuticas para administrarlos quedarán claros para el médico.
- 30
- 35 Cuando dos o más sustancias o principios van a usarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, pueden administrarse por medio de la misma vía de administración o por medio de diferentes vías de administración, a esencialmente el mismo tiempo o en diferentes veces (por ejemplo, esencialmente de manera simultánea, consecutiva, o según un régimen alterno). Cuando las sustancias o principios van a administrarse simultáneamente por medio de la misma vía de administración, pueden administrarse como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, tal como quedará claro para el experto.
- 40 Además, cuando dos o más sustancias o principios activos van a usarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios puede administrarse en la misma cantidad y según el mismo régimen tal como se usa cuando el compuesto o principio se usa por sí mismo, y tal uso combinado puede conducir o no a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de las dos o más sustancias o principios activos conduce a un efecto sinérgico, puede ser también posible reducir la cantidad de una, más o todas las sustancias o principios que van a administrarse, al tiempo que todavía se logra la acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil por ejemplo para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario no deseado que esté asociado con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades habituales, al tiempo que todavía se obtiene el efecto terapéutico o farmacéutico deseado.
- 45
- 50 La eficacia del régimen de tratamiento usado según la invención puede determinarse y/o seguirse de cualquier manera conocida *per se* para la enfermedad o trastorno implicado, tal como quedará claro para el médico. El médico también será capaz de, cuando sea apropiado y en una base de caso a caso, cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados, y/o para lograr un equilibrio apropiado entre el logro del efecto terapéutico deseado por un lado y evitar, limitar o reducir efectos secundarios no deseados por otro lado.
- 55
- Generalmente, el régimen de tratamiento se seguirá hasta que se logra el efecto terapéutico deseado y/o durante tanto tiempo como se mantenga el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede determinarlo el médico.
- 60 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción, o polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad vírica; y/o para su uso en uno o más de los métodos de tratamiento mencionados en el presente documento.
- 65 El sujeto que va a tratarse puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más en particular un ser humano. Tal como quedará claro para el experto, el sujeto que va a tratarse será en particular

una persona que padece, o corre el riesgo de, las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento.

5 La invención también se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción o polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede prevenirse y/o tratarse administrando una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción o polipéptido de la invención a un paciente.

10 Más en particular, la invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos, Nanobody[®], compuesto o construcción o polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades víricas, y en particular para la prevención y el tratamiento de una o más de las enfermedades y trastornos enumerados en el presente documento.

15 De nuevo, en una composición farmacéutica de este tipo, las una o más secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], compuestos o construcciones o polipéptidos de la invención también pueden combinarse adecuadamente con uno o más de otros principios activos, tales como los mencionados en el presente documento.

20 Usos adicionales de las secuencias de aminoácidos, Nanobodies[®], polipéptidos, ácidos nucleicos, construcciones genéticas y huéspedes y células huésped de la invención quedarán claros para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Por ejemplo, y sin limitación, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden unirse a un portador o soporte sólido adecuado para proporcionar un medio que puede usarse de una manera conocida *per se* para purificar una proteína de la envoltura de un virus a partir de composiciones y preparaciones que comprenden la misma. También pueden usarse derivados de las secuencias de aminoácidos de la invención que comprenden un marcador detectable adecuado como marcadores para determinar (cualitativa o
25 cuantitativamente) la presencia de una proteína de la envoltura de un virus en una composición o preparación o como marcador para detectar selectivamente la presencia de una proteína de la envoltura de un virus en la superficie de una célula o tejido (por ejemplo, en combinación con técnicas de clasificación de células adecuadas).

30 La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes aspectos, ejemplos y figuras preferidos no limitativos:

El contenido completo de todas las referencias (incluyendo referencias bibliográficas, patentes expedidas, solicitudes de patente publicadas y solicitudes de patente en tramitación junto con la presente) mencionadas a lo largo de toda esta solicitud se incorporan expresamente por el presente documento como referencia, en particular para la
35 enseñanza a la que se hizo referencia anteriormente en el presente documento.

Las reivindicaciones en el archivo definen esencialmente la invención y los siguientes aspectos también se divulgan en el presente documento.

40 Las reivindicaciones en el archivo definen esencialmente la invención y los siguientes aspectos también se divulgan en el presente documento.

Aspecto A-1. Secuencia de aminoácidos que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh y que comprende al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

45 a) SEQ ID NO: 102;

50 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

55 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la
60 diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto A-2. Secuencia de aminoácidos según el aspecto A-1, que comprende dos o más tramos de residuos de aminoácido en los que un tramo se elige de los siguientes:

65 a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más

preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos un tramo se elige de:

c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

e) SEQ ID NO: 121; y

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos de la invención y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

Aspecto A-3. Secuencia de aminoácidos según el aspecto A-1 o A-2, que comprende tres o más tramos de residuos de aminoácido, en la que el primer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la

diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y el tercer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

5 e) SEQ ID NO: 121;

10 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

15 Aspecto A-4. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-3, que se une específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o que compite con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh.

20 Aspecto A-5. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-4, que es una secuencia de aminoácidos que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de aminoácidos sintética o semisintética.

Aspecto A-6. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-5, que comprende un pliegue de inmunoglobulina o que en condiciones adecuadas es capaz de formar un pliegue de inmunoglobulina.

25 Aspecto A-7. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-6, que es una secuencia de inmunoglobulina.

30 Aspecto A-8. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-7, que es una secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética.

35 Aspecto A-9. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-8, que es una secuencia de inmunoglobulina humanizada, una secuencia de inmunoglobulina camelizada o una secuencia de inmunoglobulina que se ha obtenido mediante técnicas tales como maduración por afinidad.

Aspecto A-10. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-9, que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia de V_H).

40 Aspecto A-11. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-10, que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o que consisten esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cadena pesada.

45 Aspecto A-12. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-11, que consiste esencialmente en un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), en un anticuerpo de un único dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de un único dominio), en un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb) o en un Nanobody[®] (incluyendo pero sin limitarse a una secuencia de V_{HH}).

50 Aspecto A-13. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-12, que consiste esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en la que CDR2 se elige de:

55 a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

60 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la

diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto A-14. Secuencia de aminoácidos según el aspecto A-13, que consiste esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en la que CDR2 se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 102; o

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos una de CDR1 o CDR3 se elige de:

- CDR1 elegida del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y/o

- CDR3 elegida del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto A-15. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-13 o A-14, que consiste en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en la que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido; y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto A-16. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-15, que comprende al menos SEQ ID NO: 102.

Aspecto A-17. Secuencia de aminoácidos según el aspecto A-16, que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

c) SEQ ID NO: 121; y

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto A-18. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-16 o A-17, que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y una secuencia de CDR1 elegida de:

a) SEQ ID NO: 98; y

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual,

aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y una secuencia de CDR3 elegida de:

5 c) SEQ ID NO: 121; y

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

15 Aspecto A-19. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-16 a A-18, que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121.

20 Aspecto A-20. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-16 a A-19, que comprende SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

Aspecto A-21. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-20, que consiste esencialmente en un Nanobody[®] que

25 a) tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157, en la que para los fines de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR no se tienen en cuenta;

30 y en la que:

b) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla A-3 a la tabla A-8 del documento WO 08/020079.

35 Aspecto A-22. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-21, que consiste esencialmente en un Nanobody[®] humanizado.

40 Aspecto A-23. Secuencia de aminoácidos según el aspecto A-22, que consiste esencialmente en un Nanobody[®] humanizado que puede unirse (tal como se define adicionalmente en el presente documento) a la proteína F de VRSh y que:

i) es una variante humanizada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (véase la tabla A-1); y/o

45 ii) tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (véase la tabla A-1) y/o al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 (véase la tabla A-4), en la que para los fines de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR no se tienen en cuenta;

50 y en la que:

iii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla A-3 a la tabla A-8 del documento WO 08/020079.

55 Aspecto A-24. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-23, que está esencialmente en forma aislada.

60 Aspecto A-25. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-24, para su administración a un sujeto, en el que dicha secuencia de aminoácidos no se produce de manera natural en dicho sujeto.

Aspecto A-26. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-25, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos.

65 Aspecto A-27. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-26, que puede unirse

específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} . de entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o más.

5 Aspecto A-28. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-27, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} . de entre $10^{-2} s^{-1}$ ($t_{1/2}=0,69 s$) y $10^{-4} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente de entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-4} s^{-1}$, o inferior.

10 Aspecto A-29. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-28, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente entre 100 nM y 500 nM, o menos.

15 Aspecto B-1. Nanobody[®] que está dirigido contra y/o que se une específicamente a la proteína F de VRSh, en el que CDR2 se elige de:

a) SEQ ID NO: 102;

20 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

25 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la
30 diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto B-2. Nanobody[®] según el aspecto B-1, en el que CDR2 se elige del grupo que consiste en:

35 a) SEQ ID NO: 102; o

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

40 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la
diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

50 y al menos una de CDR1 o CDR3 se elige de:

- CDR1 elegida del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 98;

55 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la
60 secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y/o

65 - CDR3 elegida del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto B-3. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 o B-2, en el que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto B-4. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-3, que comprende al menos SEQ ID NO: 102.

Aspecto B-5. Nanobody[®] según el aspecto B-4, que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y al menos una secuencia de CDR elegida de:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que

comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

c) SEQ ID NO: 121; y

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto B-6. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-4 o B-5, que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y una secuencia de CDR1 elegida de:

a) SEQ ID NO: 98; y

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y una secuencia de CDR3 elegida de:

c) SEQ ID NO: 121; y

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto B-7. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-4 a B-6, que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y al menos una secuencia de CDR elegida de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121.

Aspecto B-8. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-4 a B-7, que comprende SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

Aspecto B-9. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-8, que está esencialmente en forma aislada.

Aspecto B-10. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-9, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos.

Aspecto B-11. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-10, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} . de entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$ más preferiblemente de aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o más.

Aspecto B-12. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-11, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} . de entre $10^{-2} s^{-1}$ ($t_{1/2}=0,69 s$) y $10^{-4} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-4} s^{-1}$, o inferior.

Aspecto B-13. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-12, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente entre 100 nM y 500 nM, o menos.

Aspecto B-14. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-13, que es un Nanobody[®] que se produce de

manera natural (de cualquier especie adecuada) o un Nanobody[®] sintético o semisintético.

5 Aspecto B-15. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-14, que es una secuencia de V_{HH}, una secuencia de V_{HH} parcialmente humanizada, una secuencia de V_{HH} completamente humanizada, un dominio variable de cadena pesada camelizado o un Nanobody[®] que se ha obtenido mediante técnicas tales como maduración por afinidad.

10 Aspecto B-16. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-15, que es un Nanobody[®] parcialmente humanizado.

10 Aspecto B-17. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-16, que es un Nanobody[®] completamente humanizado.

15 Aspecto B-18. Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-17, que consiste esencialmente en un Nanobody[®] humanizado que puede unirse (tal como se define adicionalmente en el presente documento) a la proteína F de VRSh y que:

i) es una variante humanizada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (véase la tabla A-1); y/o

20 ii) tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 80% con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (véase la tabla A-1) y/o al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 (véase la tabla A-4), en el que para los fines de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR no se tienen en cuenta;

25 y en el que:

30 iii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla A-3 a la tabla A-8 del documento WO 08/020079.

Aspecto C-1: Secuencia de aminoácidos que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegida de las siguientes:

35 a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-2: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-1, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

50 Aspecto C-3: Secuencia de aminoácidos que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

55 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

60 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-4: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-3, que se elige de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

5 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-5: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos C-3 o C-4, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

20 Aspecto C-6: Secuencia de aminoácidos que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegida de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

25 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

30 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-7: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-6, que se elige de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-8: Secuencia de aminoácidos que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegida de las siguientes:

55 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

60 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en

comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-9: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-8, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

5 Aspecto C-10: Secuencia de aminoácidos que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegida de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico, (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-11: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-10, que se elige de las siguientes:

25 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

30 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

40 - SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

45 - SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

50 - SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

55 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto C-12: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos C-10 o C-11, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

65 Aspecto C-13: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R,

Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

5 Aspecto C-14: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que dos o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

10 Aspecto C-15: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-14, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que tres o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

15 Aspecto C-16: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-15, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cuatro o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

20 Aspecto C-17: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-16, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cinco o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

25 Aspecto C-18: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-17, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que seis o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

30 Aspecto C-19: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-18, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que siete o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

35 Aspecto C-20: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-19, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que ocho o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

40 Aspecto C-21: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-20, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que nueve o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

45 Aspecto C-22: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-21, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que diez o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

50 Aspecto C-23: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-22, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

55 Aspecto C-24: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

Aspecto C-25: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

60 Aspecto C-26: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-25, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

65 Aspecto C-27: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

Aspecto C-28: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

5 Aspecto C-29: Secuencia de aminoácidos según el aspecto C-8, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

10 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

15 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

20 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

25 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

30 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

35 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

40 Aspecto C-30: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62.

Aspecto C-31: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65.

Aspecto C-32: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76.

45 Aspecto C-33: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en cualquiera de SEQ ID NO: 146-153: 76.

50 Aspecto C-34: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos C-1 a C-33, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos.

55 Aspecto C-35: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos C-1 a C-34, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

60 Aspecto C-36: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos C-1 a C-35, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} de entre 10^{-2} s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-4} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-4} s^{-1} , o inferior.

65 Aspecto C-37: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos C-1 a C-36, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente entre 100 nM y 500 nM, o menos.

Aspecto C-38: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos C-1 a C-37, que se une específicamente

al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o que compite con Synagis® por la unión a la proteína F de VRSh.

Aspecto D-1: Nanobody® que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh, elegido de las siguientes:

5 a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

20 Aspecto D-2: Nanobody® según el aspecto D-1, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

Aspecto D-3: Nanobody® que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegido de las siguientes:

25 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

30 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

35 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

40 Aspecto D-4: Nanobody® según cualquiera del aspecto D-3, que se elige de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

55 Aspecto D-5: Nanobody® según cualquiera de los aspectos D-3 o D-4, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

Aspecto D-6: Nanobody® que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegido de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose

dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

- 5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto D-7: Nanobody[®] según cualquiera del aspecto D-6, que se elige de las siguientes:

- 10 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

- 15 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20 la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 Aspecto D-8: Nanobody[®] que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegido de las siguientes:

- a) SEQ ID NO: 146-153;

30 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

- 35 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto D-9: Nanobody según el aspecto D-8, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

45 Aspecto D-10: Nanobody que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegido de las siguientes:

- a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

50 b) secuencias de aminoácidos que tienen no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 diferencia de aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

- 55 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

60 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto D-11: Nanobody según el aspecto D-10, que se elige de las siguientes:

- 65 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más

preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- 10 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- 15 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;
- 20 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;
- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;
- 25 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 Aspecto D-12: Nanobody según cualquiera de los aspectos D-10 o D-11, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

40 Aspecto D-13: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

45 Aspecto D-14: Nanobody[®] según el aspecto D-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que dos o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

50 Aspecto D-15: Nanobody[®] según el aspecto D-14, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que tres o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

55 Aspecto D-16: Nanobody[®] según el aspecto D-15, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cuatro o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

60 Aspecto D-17: Nanobody[®] según el aspecto D-16, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cinco o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

65 Aspecto D-18: Nanobody[®] según el aspecto D-17, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que seis o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

Aspecto D-19: Nanobody[®] según el aspecto D-18, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que siete o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

Aspecto D-20: Nanobody[®] según el aspecto D-19, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que ocho o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro,

Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

5 Aspecto D-21: Nanobody[®] según el aspecto D-20, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que nueve o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

10 Aspecto D-22: Nanobody[®] según el aspecto D-21, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que diez o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

Aspecto D-23: Nanobody[®] según el aspecto D-22, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

15 Aspecto D-24: Nanobody[®] según el aspecto D-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

20 Aspecto D-25: Nanobody[®] según el aspecto D-8, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

25 Aspecto D-26: Nanobody[®] según el aspecto D-20, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

Aspecto D-27: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

30 Aspecto D-28: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

35 Aspecto D-29: Nanobody[®] según el aspecto D-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

40 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg108Gln;

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

45 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

50 - Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

55 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

60 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

65 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

- Aspecto D-30: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62.
- Aspecto D-31: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65.
- 5 Aspecto D-32: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76.
- Aspecto D-33: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en cualquiera de SEQ ID NO: 146-153.
- 10 Aspecto D-34: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos D-1 a D-33, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos.
- 15 Aspecto D-35: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos D-1 a D-34, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ a aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o más.
- 20 Aspecto D-36: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos D-1 a D-35, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} de entre $10^{-2} s^{-1}$ ($t_{1/2}=0,69 s$) y $10^{-4} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-4} s^{-1}$, o inferior.
- Aspecto D-37: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos D-1 a D-36, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente entre 100 nM y 500 nM, o menos.
- 25 Aspecto D-38: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos D-1 a D-37, que se une específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o que compite con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh.
- Aspecto W-1: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29 y C-1 a C-38, que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh, en la que la secuencia de aminoácidos tiene ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat).
- 30 Aspecto W-2: Secuencia de aminoácidos que está dirigida contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh elegida de las siguientes:
- 35 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:
- 40 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
- 45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.
- 50 Aspecto W-3: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-2, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.
- Aspecto W-4: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 55 Aspecto W-5: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- Aspecto W-6: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 60 Aspecto W-7: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- Aspecto W-8: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.
- 65 Aspecto W-9: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la

que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto W-10: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 Aspecto W-11: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 Aspecto W-12: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 Aspecto W-13: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-12, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que dos o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

20 Aspecto W-14: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que tres o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

25 Aspecto W-15: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-14, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cuatro o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

30 Aspecto W-16: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-15, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cinco o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

35 Aspecto W-17: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-16, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que seis o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser29R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

40 Aspecto W-18: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-17, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que siete o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

45 Aspecto W-19: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-18, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que ocho o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

50 Aspecto W-20: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-19, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que nueve o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

55 Aspecto W-21: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-20, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que diez o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

60 Aspecto W-22: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-21, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

65 Aspecto W-23: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-12, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en

la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 Aspecto W-24: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-12, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 Aspecto W-25: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-24, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 Aspecto W-26: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

20 Aspecto W-27: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto W-28: Secuencia de aminoácidos según el aspecto W-2 o W-3, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

25 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

30 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

35 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Glu1Asp y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

40 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

45 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

50 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

55 Aspecto W-29: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 138.

Aspecto W-30: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 139.

Aspecto W-31: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 140.

60 Aspecto W-32: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 141.

Aspecto W-33: Secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste esencialmente en cualquiera de SEQ ID NO: 154-157.

65 Aspecto W-34: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos W-1 a W-33, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos,

preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos.

Aspecto W-35: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos W-1 a W-34, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o más.

Aspecto W-36: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos W-1 a W-35, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} de entre 10^{-2} s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-4} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-4} s^{-1} , o inferior.

Aspecto W-37: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos W-1 a W-36, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente entre 100 nM y 500 nM, o menos.

Aspecto W-38: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos W-1 a W-37, que se une específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o que compite con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh.

Aspecto X-1: Nanobody que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18 y D-1 a D-38, en el que el Nanobody tiene ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat).

Aspecto X-2: Nanobody[®] que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh, elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO; 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto X-3: Nanobody[®] según el aspecto X-2, que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

Aspecto X-4: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-5: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-6: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-7: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-8: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-9: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-10: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-11: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 Aspecto X-12: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 Aspecto X-13: Nanobody[®] según el aspecto X-12, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que dos o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 Aspecto X-14: Nanobody[®] según el aspecto X-13, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que tres o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

20 Aspecto X-15: Nanobody[®] según el aspecto X-14, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cuatro o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

25 Aspecto X-16: Nanobody[®] según el aspecto X-15, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que cinco o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

30 Aspecto X-17: Nanobody[®] según el aspecto X-16, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que seis o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

35 Aspecto X-18: Nanobody[®] según el aspecto X-17, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que siete o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

40 Aspecto X-19: Nanobody[®] según el aspecto X-18, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que ocho o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

45 Aspecto X-20: Nanobody[®] según el aspecto X-19, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que nueve o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

50 Aspecto X-21: Nanobody[®] según el aspecto X-20, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que diez o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

55 Aspecto X-22: Nanobody[®] según el aspecto X-21, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

60 Aspecto X-23: Nanobody[®] según el aspecto X-12, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

65 Aspecto X-24: Nanobody[®] según el aspecto X-12, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto X-25: Nanobody[®] según el aspecto X-24, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5,

en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 Aspecto X-26: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 Aspecto X-27: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 Aspecto X-28: Nanobody[®] según el aspecto X-2, que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- 20 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 25 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- Glu1Asp y Gly54Asp;
- 30 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 35 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- 40 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

45 Aspecto X-29: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 138.

Aspecto X-30: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 139.

50 Aspecto X-31: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 140.

Aspecto X-32: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 141.

55 Aspecto X-33: Nanobody[®] que comprende o que consiste esencialmente en cualquiera de SEQ ID NO: 154-157.

Aspecto X-34: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos X-1 a X-33, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos.

60 Aspecto X-35: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos X-1 a X-34, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} . de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

65 Aspecto X-36: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos X-1 a X-35, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} . de entre 10^{-2} s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-4} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-4} s^{-1} , o inferior.

Aspecto X-37: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos X-1 a X-36, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} de entre 100 nM y 1000 nM, preferiblemente entre 100 nM y 500 nM, o menos.

Aspecto X-38: Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos X-1 a X-37, que se une específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o que compite con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh.

Aspecto E-1: Polipéptido que comprende o consiste esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 y/o uno o más Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, y opcionalmente comprende además uno o más de otras unidades de unión de aminoácidos, opcionalmente unidas por medio de uno o más conectores peptídicos.

Aspecto E-2: Polipéptido según el aspecto E-1, en el que dicha una o más de otras unidades de unión son secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto E-3: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 o E-2, en el que dicha una o más de otras unidades de unión se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies[®].

Aspecto E-4: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-3, en el que dicha una o más secuencias de aminoácidos son secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto E-5: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-4, en el que dicha una o más secuencias de aminoácidos se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies[®].

Aspecto E-6: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-5, que comprende o consiste esencialmente en uno o más Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-8 y X-1 a X-38 y en el que dicha una o más de otras unidades de unión son Nanobodies[®].

Aspecto E-7: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-6, que es una construcción multivalente.

Aspecto E-8: Polipéptido multivalente según el aspecto E-7, que comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29 y C-1 a C-38 y/o Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18 y D-1 a D-38 y/o al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos W-1 a W-38 y/o al menos un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos X-1 a X-38.

Aspecto E-9: Polipéptido multivalente según el aspecto E-8, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

Aspecto E-10: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-9, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-11: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-10, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo

de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

5 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

10 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido
15 tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos un tramo se elige de:

20 c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que
25 comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

30 e) SEQ ID NO: 121; y

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que
35 comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

40 de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos de la invención y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

45 Aspecto E-12: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-11, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 98;

50 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la
55 secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

un segundo tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

60 c) SEQ ID NO: 102;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

65 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido; y

un tercer tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121;

f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-13: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-12, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102.

Aspecto E-14: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-13, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

c) SEQ ID NO: 121; y

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-15: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-14, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y una secuencia de CDR1 elegida de:

a) SEQ ID NO: 98;

b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y una secuencia de CDR3 elegida de:

c) SEQ ID NO: 121;

- d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.
- Aspecto E-16: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-15, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121.
- Aspecto E-17: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-16, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.
- Aspecto E-18: Polipéptido multivalente según cualquiera del aspecto E-8 a E-17, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.
- Aspecto E-19: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-9, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:
- a) SEQ ID NO: 60-76;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:
- i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
- ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.
- Aspecto E-20: Polipéptido multivalente según el aspecto E-19, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.
- Aspecto E-21: Polipéptido multivalente según el aspecto E-20, que comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.
- Aspecto E-22: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-9, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:
- a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:
- i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y
- ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.
- Aspecto E-23: Polipéptido multivalente según el aspecto E-22, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:
- a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

10 Aspecto E-24: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-22 o E-23, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

15 Aspecto E-25: Polipéptido multivalente según el aspecto E-24, que comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

Aspecto E-26: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-9, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

20 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 Aspecto E-27: Polipéptido multivalente según el aspecto E-26, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-28: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-26 o E-27, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

55 Aspecto E-29: Polipéptido multivalente según el aspecto E-28, que comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de SEQ ID NO: 65 y 76.

Aspecto E-30: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-9, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la

numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-31: Polipéptido multivalente según el aspecto E-30, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

Aspecto E-32: Polipéptido multivalente según el aspecto E-31, que comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

Aspecto E-33: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-9, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-34: Polipéptido multivalente según el aspecto E-33, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o

superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

5 Aspecto E-35: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-33 o E-34, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

10 Aspecto E-36: Polipéptido multivalente según el aspecto E-35, que comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75, 76, 147, 149 y 153.

15 Aspecto E-37: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

20 Aspecto E-38: Polipéptido multivalente según el aspecto E-37, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

25 Aspecto E-39: Polipéptido multivalente según el aspecto E-37, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

30 Aspecto E-40: Polipéptido multivalente según el aspecto E-37, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro o cinco) se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

35 Aspecto E-41: Polipéptido multivalente según el aspecto E-40, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

40 Aspecto E-42: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres o cuatro) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

45 Aspecto E-43: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

50 Aspecto E-44: Polipéptido multivalente según el aspecto E-37, que comprende o que consiste esencialmente en al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

55 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

60 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

65 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
 - 5 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
 - 10 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.
- Aspecto E-45: Polipéptido multivalente según el aspecto E-7, que comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 y/o Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38.
- Aspecto E-46: Polipéptido multivalente según el aspecto E-45, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.
- 20 Aspecto E-47: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de las siguientes:
- 25 a) SEQ ID NO: 102;
 - b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:
 - 30 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y
 - ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.
 - 40 Aspecto E-48: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de las siguientes:
 - 45 a) SEQ ID NO: 102;
 - b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:
 - 50 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y
 - ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;
- y al menos un tramo se elige de:
- 60 c) SEQ ID NO: 98;
 - d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 diferencia de aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de
 - 65

aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

5 e) SEQ ID NO: 121; y

10 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

15 de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a una de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos de la invención y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

20 Aspecto E-49: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 98; y

25 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

un segundo tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

35 c) SEQ ID NO: 102; y

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

40 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

50 y un tercer tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121; y

55 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

65 Aspecto E-50: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 a E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102.

Aspecto E-51: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 a E-46, que comprende o que

consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de:

5 a) SEQ ID NO: 98;

10 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

15 c) SEQ ID NO: 121; y

20 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 Aspecto E-52: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 a E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y una secuencia de CDR1 elegida de:

30 a) SEQ ID NO: 98; y

35 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y una secuencia de CDR3 elegida de:

40 c) SEQ ID NO: 121; y

45 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

50 Aspecto E-53: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 a E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121.

55 Aspecto E-54: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 a E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

60 Aspecto E-55: Polipéptido multivalente según cualquiera del aspecto E-47 a E-53, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

Aspecto E-56: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

65 a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

10 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-57: Polipéptido multivalente según el aspecto E-56, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

15 Aspecto E-58: Polipéptido multivalente según el aspecto E-57, que comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.

Aspecto E-59: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

20 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 Aspecto E-60: Polipéptido multivalente según el aspecto E-59, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-61: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-59 o E-60, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

55 Aspecto E-62: Polipéptido multivalente según el aspecto E-61, que comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

Aspecto E-63: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la

posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

- 5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

10 Aspecto E-64: Polipéptido multivalente según el aspecto E-63, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

15 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

25 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-65: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-63 o E-64, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

30 Aspecto E-66: Polipéptido multivalente según el aspecto E-65, que comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de SEQ ID NO: 65 y 76.

Aspecto E-67: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

35 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

50 Aspecto E-68: Polipéptido multivalente según el aspecto E-67, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

Aspecto E-69: Polipéptido multivalente según el aspecto E-68, que comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

55 Aspecto E-70: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-45 o E-46, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

60 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-71: Polipéptido multivalente según el aspecto E-70, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

20 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

25 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

30 - SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

35 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

45 Aspecto E-72: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-70 o E-71, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® son idénticos.

50 Aspecto E-73: Polipéptido multivalente según el aspecto E-72, que comprende o consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75, 76, 147, 149 y 153.

55 Aspecto E-74: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

60 Aspecto E-75: Polipéptido multivalente según el aspecto E-74, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

65 Aspecto E-76: Polipéptido multivalente según el aspecto E-74, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) se han mutado seleccionados de los siguientes:

Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

Aspecto E-77: Polipéptido multivalente según el aspecto E-74, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro o cinco) se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

Aspecto E-78: Polipéptido multivalente según el aspecto E-77, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

Aspecto E-79: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres o cuatro) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

Aspecto E-80: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

Aspecto E-81: Polipéptido multivalente según el aspecto E-74, que comprende o que consiste esencialmente en al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

Aspecto E-82: Polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-9, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o

superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

5 Aspecto E-83: Polipéptido multivalente según el aspecto E-82, que comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] elegido de una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

10 Aspecto E-84: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 Aspecto E-85: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-86: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

20 Aspecto E-87: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

25 Aspecto E-88: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

30 Aspecto E-89: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

35 Aspecto E-90: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-91: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

40 Aspecto E-92: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

45 Aspecto E-93: Polipéptido multivalente según el aspecto E-92, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

50 Aspecto E-94: Polipéptido multivalente según el aspecto E-92, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

55 Aspecto E-95: Polipéptido multivalente según el aspecto E-92, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro o cinco) se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

60 Aspecto E-96: Polipéptido multivalente según el aspecto E-95, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

65

Aspecto E-97: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres o cuatro) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 Aspecto E-98: Polipéptido multivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 Aspecto E-99: Polipéptido multivalente según el aspecto E-92, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- 15 - Glu1Asp;
- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- 20 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 25 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- 30 - Glu1Asp y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- 35 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- 40 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- 45 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

50 Aspecto E-100: Polipéptido bivalente según el aspecto E-7, que comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 y/o Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38.

Aspecto E-101: Polipéptido bivalente según el aspecto E-100, en el que dichas dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

55 Aspecto E-102: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

- 60 a) SEQ ID NO: 102;
- b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:
- 65 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

10 Aspecto E-103: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 102;

15 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y al menos un tramo se elige de:

30 c) SEQ ID NO: 98;

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

40 e) SEQ ID NO: 121; y

45 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

50 de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos de la invención y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

55 Aspecto E-104: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:

a) SEQ ID NO: 98;

60 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

un segundo tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

c) SEQ ID NO: 102;

5 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

10 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y un tercer tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

20 e) SEQ ID NO: 121;

25 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

30 Aspecto E-105: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102.

35 Aspecto E-106: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de:

a) SEQ ID NO: 98;

40 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

c) SEQ ID NO: 121; y

50 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

60 Aspecto E-107: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y una secuencia de CDR1 elegida de:

a) SEQ ID NO: 98; y

65 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual,

aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

- 5 y una secuencia de CDR3 elegida de:
- c) SEQ ID NO: 121; y
- 10 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual,
- 15 aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-108: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121.

Aspecto E-109: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

Aspecto E-110: Polipéptido bivalente según cualquiera del aspecto E-102 al E-109, en el que dichas al menos dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

30 Aspecto E-111: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

35 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

45 Aspecto E-112: Polipéptido bivalente según el aspecto E-111, en el que dichas dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

50 Aspecto E-113: Polipéptido bivalente según el aspecto E-112, que comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.

Aspecto E-114: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

55 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

60 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en

comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-115: Polipéptido bivalente según el aspecto E-114, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

5 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

10 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

15 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

20 Aspecto E-116: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-114 o E-115, en el que dichas dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® son idénticos.

Aspecto E-117: Polipéptido bivalente según el aspecto E-116, que comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

25 Aspecto E-118: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

30 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

35 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-119: Polipéptido bivalente según el aspecto E-118, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

45 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

50 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

60 Aspecto E-120: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-118 o E-119, en el que dichas dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® son idénticos.

Aspecto E-121: Polipéptido bivalente según el aspecto E-120, que comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® idénticos elegidos de SEQ ID NO: 65 y 76.

65 Aspecto E-122: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-123: Polipéptido bivalente según el aspecto E-122, en el que dichas dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

Aspecto E-124: Polipéptido bivalente según el aspecto E-123, que comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

Aspecto E-125: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-126: Polipéptido bivalente según el aspecto E-125, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

5

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

10

Aspecto E-127: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-125 o E-126, en el que dichas dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

15

Aspecto E-128: Polipéptido bivalente según el aspecto E-127, que comprende o consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75, 76, 147, 149 y 153.

20

Aspecto E-129: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

25

Aspecto E-130: Polipéptido bivalente según el aspecto E-129, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

30

Aspecto E-131: Polipéptido bivalente según el aspecto E-129, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

35

Aspecto E-132: Polipéptido bivalente según el aspecto E-129, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro o cinco) se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

40

Aspecto E-133: Polipéptido bivalente según el aspecto E-132, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

45

Aspecto E-134: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres o cuatro) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

50

Aspecto E-135: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más residuos de aminoácido (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

55

Aspecto E-136: Polipéptido bivalente según el aspecto E-129, que comprende o que consiste esencialmente en dos secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

60

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

65

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- 5 - Gly54Asp;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- 10 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- 15 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- 20 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

Aspecto E-137: Polipéptido bivalente según cualquiera de los aspectos E-100 o E-101, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® elegidos de las siguientes:

- 25 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:
 - 30 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
 - ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos
 - 35 tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-138: Polipéptido bivalente según el aspecto E-137, que comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® elegido de una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

40 Aspecto E-139: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

45 Aspecto E-140: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

50 Aspecto E-141: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

55 Aspecto E-142: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

60 Aspecto E-143: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

65 Aspecto E-144: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

Aspecto E-145: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido

aspártico.

5 Aspecto E-146: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

10 Aspecto E-147: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

15 Aspecto E-148: Polipéptido bivalente según el aspecto E-147, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

20 Aspecto E-149: Polipéptido bivalente según el aspecto E-147, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

25 Aspecto E-150: Polipéptido bivalente según el aspecto E-147, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

30 Aspecto E-151: Polipéptido bivalente según el aspecto E-150, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

35 Aspecto E-152: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

40 Aspecto E-153: Polipéptido bivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico.

45 Aspecto E-154: Polipéptido bivalente según el aspecto E-147, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Glu1Asp;

50 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

55 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

60 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Glu1Asp y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

65 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
 - 5 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
 - 10 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.
- Aspecto E-155: Polipéptido trivalente según el aspecto E-7, que comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 y/o Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38.
- 15 Aspecto E-156: Polipéptido trivalente según el aspecto E-155, en el que dichas tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.
- 20 Aspecto E-157: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:
- 25 a) SEQ ID NO: 102;
- b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:
- 30 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y
- ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido
- 35 tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.
- 40 Aspecto E-158: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de los siguientes:
- 45 a) SEQ ID NO: 102;
- b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:
- 50 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y
- ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido
- 55 tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;
- y al menos un tramo se elige de:
- 60 c) SEQ ID NO: 98;
- d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que
- 65 comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la

secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

5 e) SEQ ID NO: 121; y

10 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

15 de manera que el tramo de residuos de aminoácido que corresponde a uno de a) y b) debe estar presente siempre en la secuencia de aminoácidos de la invención y de manera que el segundo tramo de residuos de aminoácido se elige de uno de c), d), e) y f).

20 Aspecto E-159: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos un tramo de residuos de aminoácido elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 98; y

25 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

un segundo tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

35 c) SEQ ID NO: 102; y

d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 102, siempre que:

40 i) dicho tramo de residuos de aminoácido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 6 (posición 54 determinada según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

50 y un tercer tramo de residuos de aminoácido elegido del grupo que consiste en:

e) SEQ ID NO: 121; y

55 f) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

60 Aspecto E-160: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102.

65 Aspecto E-161: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que

consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de:

5 a) SEQ ID NO: 98;

10 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

15 c) SEQ ID NO: 121; y

20 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 Aspecto E-162: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprende al menos SEQ ID NO: 102 y una secuencia de CDR1 elegida de:

30 a) SEQ ID NO: 98; y

35 b) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 98, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

y una secuencia de CDR3 elegida de:

40 c) SEQ ID NO: 121; y

45 d) un tramo de residuos de aminoácido que tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con SEQ ID NO: 121, siempre que la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos que comprende dicho tramo de residuos de aminoácido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

50 Aspecto E-163: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden al menos SEQ ID NO: 102 y al menos un tramo de residuos de aminoácido (secuencia de CDR) elegido de SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 121.

55 Aspecto E-164: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] que comprenden SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 121.

60 Aspecto E-165: Polipéptido trivalente según cualquiera del aspecto E-157 al E-164, en el que dichas al menos tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

Aspecto E-166: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

65 a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

10 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-167: Polipéptido trivalente según el aspecto E-166, en el que dichas tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

15 Aspecto E-168: Polipéptido trivalente según el aspecto E-167, que comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 60-76.

Aspecto E-169: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

20 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

35 Aspecto E-170: Polipéptido trivalente según el aspecto E-169, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-171: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-169 o E-170, en el que dichas tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] son idénticos.

55 Aspecto E-172: Polipéptido trivalente según el aspecto E-171, que comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

Aspecto E-173: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] elegidos de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose

dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-174: Polipéptido trivalente según el aspecto E-173, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-175: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-173 o E-174, en el que dichas tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® son idénticos.

Aspecto E-176: Polipéptido trivalente según el aspecto E-175, que comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® idénticos elegidos de SEQ ID NO: 65 y 76.

Aspecto E-177: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-178: Polipéptido trivalente según el aspecto E-177, en el que dichas tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® son idénticos.

Aspecto E-179: Polipéptido trivalente según el aspecto E-178, que comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 146-153.

Aspecto E-180: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

5 Aspecto E-181: Polipéptido trivalente según el aspecto E-180, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® elegidos de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

10 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

20 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

25 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

30 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

35 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

45 Aspecto E-182: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-180 o E-181, en el que dichas tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® son idénticos.

50 Aspecto E-183: Polipéptido trivalente según el aspecto E-182, que comprende o consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® idénticos elegidos de una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75, 76, 147, 149 y 153.

55 Aspecto E-184: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

60 Aspecto E-185: Polipéptido trivalente según el aspecto E-184, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

65 Aspecto E-186: Polipéptido trivalente según el aspecto E-184, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

- 5 Aspecto E-187: Polipéptido trivalente según el aspecto E-184, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.
- 10 Aspecto E-188: Polipéptido trivalente según el aspecto E-187, que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.
- 15 Aspecto E-189: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.
- 20 Aspecto E-190: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.
- 25 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 30 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- 35 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- Gly54Asp;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- 40 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- 45 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- 50 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.
- 55 Aspecto E-192: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 62.
- Aspecto E-193: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 65.
- 60 Aspecto E-194: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 76.
- Aspecto E-195: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies® con SEQ ID NO: 75.
- 65 Aspecto E-196: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de

aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 147.

Aspecto E-197: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 149.

5 Aspecto E-198: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en tres secuencias de aminoácidos y/o Nanobodies[®] con SEQ ID NO: 153.

10 Aspecto E-199: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-155 o E-156, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] elegido de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

15 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 Aspecto E-200: Polipéptido trivalente según el aspecto E-199, que comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] elegido de una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

30 Aspecto E-201: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

35 Aspecto E-202: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

40 Aspecto E-203: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

45 Aspecto E-204: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

50 Aspecto E-205: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

55 Aspecto E-206: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

60 Aspecto E-207: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

65 Aspecto E-208: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-209: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody[®] con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-210: Polipéptido trivalente según el aspecto E-209, que comprende o que consiste esencialmente en al

menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

5 Aspecto E-211: Polipéptido trivalente según el aspecto E-209, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

10 Aspecto E-212: Polipéptido trivalente según el aspecto E-209, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

15 Aspecto E-213: Polipéptido trivalente según el aspecto E-212, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico.

20 Aspecto E-214: Polipéptido trivalente según el aspecto E-209, que comprende o que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanobody® con SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

25 - Glu1Asp;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

30 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

35 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Glu1Asp y Gly54Asp;

40 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

45 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

50 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

55 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

Aspecto E-215: Polipéptido trivalente que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh, elegido de los siguientes polipéptidos:

60 a) SEQ ID NO: 77-79 y 158;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 77-79 y 158, siempre que:

65 i) las secuencias de aminoácidos o Nanobodies® abarcados en dicho polipéptido tengan una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y/o un ácido

glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

- 5 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-216: Polipéptido trivalente según el aspecto E-215, elegido de los siguientes polipéptidos:

- 10 a) SEQ ID NO: 77-79 y 158;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 77-79 y 158, siempre que:

- 15 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

- 20 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

25 Aspecto-217: Polipéptido trivalente que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh, elegido de los siguientes polipéptidos:

- a) SEQ ID NO: 78 y 79;

30 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 78 y 79, siempre que:

- 35 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y/o un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

- 40 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-218: Polipéptido trivalente según el aspecto E-217, elegido de los siguientes polipéptidos:

- 45 a) SEQ ID NO: 78 y 79; o

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 78 y 79, siempre que:

- 50 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

- 55 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

60 Aspecto E-219: Polipéptido trivalente que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh, elegido de los siguientes polipéptidos:

- a) SEQ ID NO: 159-161;

65 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

10 Aspecto E-220: Polipéptido trivalente según el aspecto E-219, elegido de los siguientes polipéptidos:

a) SEQ ID NO: 159-161;

15 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

25 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

Aspecto E-221: Polipéptido trivalente según cualquiera de los aspectos E-219 o E-220, elegido de los siguientes polipéptidos:

30 a) SEQ ID NO: 159-161;

b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:

35 i) la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando el polipéptido tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

40 - SEQ ID NO: 159, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

45 - SEQ ID NO: 160, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

50 - SEQ ID NO: 161, la secuencia de aminoácidos o Nanobody[®] abarcado en dicho polipéptido tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

60 Aspecto E-222: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

65 Aspecto E-223: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu,

Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D.

5 Aspecto E-224: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

10 Aspecto E-225: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

15 Aspecto E-226: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D.

20 Aspecto E-227: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu.

25 Aspecto E-228: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu.

30 Aspecto E-229: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

35 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

40 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

45 - Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

50 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

55 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

60 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.

Aspecto E-230: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 77.

65 Aspecto E-231: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 78.

Aspecto E-232: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 79.

Aspecto E-233: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 159-161.

5 Aspecto E-234: Polipéptido trivalente que está dirigido contra y/o se une específicamente a la proteína F de VRSh, elegido de los siguientes polipéptidos:

a) SEQ ID NO: 142-145 y 162-165;

10 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 142-145 y 162-165, siempre que:

i) la primera secuencia de aminoácidos o Nanobody® abarcado en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1; y

15 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o el polipéptido tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

20 Aspecto E-235: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

25 Aspecto E-236: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 77, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-237: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 78, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

30 Aspecto E-238: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 79, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-239: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 158, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

35 Aspecto E-240: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 159, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

40 Aspecto E-241: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 160, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-242: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 161, en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

45 Aspecto E-243: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

50 Aspecto E-244: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

55 Aspecto E-245: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

60 Aspecto E-246: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody®/Nanobodies® (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado

65

seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

5 Aspecto E-247: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

10 Aspecto E-248: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

15 Aspecto E-249: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

20 Aspecto E-250: Polipéptido trivalente que comprende o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, en la que en al menos un Nanobody[®]/Nanobodies[®] (preferiblemente en dos, más preferiblemente en los tres) que forma(n) parte de SEQ ID NO: 53, se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

25 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

30 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

35 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

40 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

45 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

50 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,

55 y en la que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico.

Aspecto E-251: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 142.

Aspecto E-252: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 143.

60 Aspecto E-253: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 144.

Aspecto E-254: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 145.

65 Aspecto E-255: Polipéptido trivalente que comprende o consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 162-165.

Aspecto E-256: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-255, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 100 nM a 0,1 nM o menos, preferiblemente de 10 nM a 0,1 nM o menos, más preferiblemente de 1 nM a 0,1 nM o menos.

- 5 Aspecto E-257: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-256, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de $k_{aso.}$ de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

- 10 Aspecto E-258: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-257, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de $k_{dis.}$ de entre 10^{-2} s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-4} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-4} s^{-1} , más preferiblemente entre $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y 10^{-4} s^{-1} , o inferior.

- 15 Aspecto E-259: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-258, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} de entre 10 pM y 1000 pM, preferiblemente entre 10 pM y 250 pM, más preferiblemente entre 50 pM y 200 pM o menos.

- 20 Aspecto E-260: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-259, que puede neutralizar VRSh (por ejemplo, tal como se mide en un ensayo de microneutralización en VRSh Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6) con un valor de CI_{50} que es al menos igual y preferiblemente mejor, al menos diez veces mejor, preferiblemente veinte veces mejor, más preferiblemente cincuenta veces mejor, incluso más preferiblemente sesenta, setenta, ochenta o más veces mejor en comparación con el valor de CI_{50} obtenido con Synagis®.

- 25 Aspecto E-261: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-260, que es una construcción multiespecífica.

Aspecto F-1: Construcción monovalente, que comprende o que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 y/o un Nanobody® según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38.

- 30 Aspecto F-2: Construcción monovalente según el aspecto F-1, en el que dicha secuencia de aminoácidos se elige del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies®.
- 35

Aspecto F-3: Construcción monovalente, que comprende o que consiste esencialmente en un Nanobody® según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38.

- 40 Aspecto F-4: Construcción monovalente, que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60-76, SEQ ID NO: 138-141 y SEQ ID NO: 146-157.

Aspecto F-5: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, en la preparación de un polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-1 a E-261.

- 45 Aspecto F-6: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-5, en el que la construcción monovalente se usa como dominio de unión o unidad de unión en la preparación de una construcción multivalente que comprende dos o más unidades de unión.

- 50 Aspecto F-7: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 o F-6, en la preparación de un polipéptido multivalente que presenta preferiblemente unión intramolecular en comparación con unión intermolecular.

- 55 Aspecto F-8: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-7, como dominio de unión o unidad de unión en la preparación de una construcción multivalente, en el que los dominios de unión o unidades de unión se unen por medio de un conector de manera que el polipéptido multivalente presenta preferiblemente unión intramolecular en comparación con unión intermolecular y/o el polipéptido multivalente puede unirse simultáneamente a todos los sitios de unión en la proteína F de VRSh.

- 60 Aspecto F-9: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

- 65 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

10 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-10: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-9, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

15 Aspecto F-11: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

20 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido multivalente.

35 Aspecto F-12: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-11, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76; o

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

50 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-13: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-11 o F-12, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

55 Aspecto F-14: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

60 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

5 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-15: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-14, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

25 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-16: Uso de una construcción monovalente que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62 en la preparación de un polipéptido multivalente.

30 Aspecto F-17: Uso de una construcción monovalente que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-18: Uso de una construcción monovalente que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76 en la preparación de un polipéptido multivalente.

35 Aspecto F-19: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en la que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

40 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido multivalente.

55 Aspecto F-20: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-19, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

Aspecto F-21: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19,

leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108; y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

10 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-22: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-21, en el que la construcción monovalente se elige de los siguientes:

15 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

25 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

30 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

35 - SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

40 - SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

50 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-23: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-21 o F-22, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

55 Aspecto F-24: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido multivalente.

60 Aspecto F-25: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-24, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, en la preparación de un polipéptido multivalente.

65

- 5 Aspecto F-26: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-24, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido multivalente.
- 10 Aspecto F-27: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-24, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido multivalente.
- 15 Aspecto F-28: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-27, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido multivalente.
- 20 Aspecto F-29: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido multivalente.
- 25 Aspecto F-30: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido multivalente.
- 30 Aspecto F-31: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-24, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:
- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
 - Gly54Asp;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,
- en la preparación de un polipéptido multivalente.
- 60 Aspecto F-32: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:
- a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
 - b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Gln, Q) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

10 en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-33: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-32, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

15 Aspecto F-34: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

20 Aspecto F-35: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

25 Aspecto F-36: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

30 Aspecto F-37: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

Aspecto F-38: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

35 Aspecto F-39: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

40 Aspecto F-40: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

45 Aspecto F-41: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

50 Aspecto F-42: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

55 Aspecto F-43: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-42, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

60 Aspecto F-44: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-42, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

65 Aspecto F-45: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-42, en el que la construcción monovalente

consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

5 Aspecto F-46: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-42, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

10 Aspecto F-47: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

15 Aspecto F-48: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-5 a F-8, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido multivalente.

20 Aspecto F-49: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-42, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

25 - Glu1Asp;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

30 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

35 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

40 - Glu1Asp y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

45 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

50 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

55 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,

en la preparación de una construcción multivalente.

60 Aspecto F-50: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-51: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-50, en la preparación de una construcción bivalente que presenta preferiblemente unión intramolecular en comparación con unión intermolecular.

65 Aspecto F-52: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-51, como

dominio de unión o unidad de unión en la preparación de un polipéptido bivalente, en el que los dominios de unión o unidades de unión se unen por medio de un conector de manera que polipéptido bivalente presenta preferiblemente unión intramolecular en comparación con unión intermolecular y/o el polipéptido bivalente puede unirse simultáneamente a ambos sitios de unión en la proteína F de VRSh.

5 Aspecto F-53: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

25 Aspecto F-54: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-53, en el que las dos construcciones monovalentes son idénticas.

Aspecto F-55: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-53 o F-54, en el que las dos construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

30 Aspecto F-56: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

35 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

50 Aspecto F-57: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-56, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

55 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

60 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

65 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-58: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-56 o F-57, en el que las dos construcciones monovalentes son idénticas.

5 Aspecto F-59: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-58, en el que las dos construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

Aspecto F-60: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

10 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

15 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

20 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

25 Aspecto F-61: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-60, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

30 a) SEQ ID NO: 65 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

35 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

40 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

45 Aspecto F-62: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-60 o F-61, en el que las dos construcciones monovalentes son idénticas.

Aspecto F-63: Uso de dos construcciones monovalentes que consisten esencialmente en SEQ ID NO: 62 en la preparación de un polipéptido bivalente.

50 Aspecto F-64: Uso de dos construcciones monovalentes que consisten esencialmente en SEQ ID NO: 65 en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-65: Uso de dos construcciones monovalentes que consisten esencialmente en SEQ ID NO: 76 en la preparación de un polipéptido bivalente.

55 Aspecto F-66: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

60 a) SEQ ID NO: 146-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la

numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

10 Aspecto F-67: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-66, en el que las dos construcciones monovalentes son idénticas.

Aspecto F-68: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-66 o F-67, en el que las dos construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

15 Aspecto F-69: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

20 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

25 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido bivalente.

35 Aspecto F-70: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-69, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

40 a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con:

50 - SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

55 - SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

60 - SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

- SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

65 - SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

(determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

10 en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-71: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-69 o F-70, en el que las dos construcciones monovalentes son idénticas.

15 Aspecto F-72: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-71, en el que las dos construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

Aspecto F-73: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido bivalente.

25 Aspecto F-74: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-73, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, en la preparación de un polipéptido bivalente.

30 Aspecto F-75: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-73, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido bivalente.

35 Aspecto F-76: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-73, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido bivalente.

40 Aspecto F-77: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-76, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido bivalente.

45 Aspecto F-78: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido bivalente.

50 Aspecto F-79: Uso de dos construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido bivalente.

55 Aspecto F-80: Uso de dos construcciones monovalentes según el aspecto F-73, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

60 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

65 - Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Gly54Asp;
- 5 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 10 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- 15 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,
- 20 en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-81: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente se elige de las siguientes:

- 25 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:
 - 30 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y
 - ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos
 - 35 tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,
- en la preparación de un polipéptido bivalente.

40 Aspecto F-82: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-81, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

45 Aspecto F-83: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

50 Aspecto F-84: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

55 Aspecto F-85: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

60 Aspecto F-86: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

65 Aspecto F-87: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-88: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-89: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

5 Aspecto F-90: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

10 Aspecto F-91: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

15 Aspecto F-92: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-91, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

20 Aspecto F-93: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-91, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

25 Aspecto F-94: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-91, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

30 Aspecto F-95: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-94, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

35 Aspecto F-96: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

40 Aspecto F-97: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-50 a F-52, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se ha cambiado a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido bivalente.

45 Aspecto F-98: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-91, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

50 - Glu1Asp;

55 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

60 - Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

65 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Glu1Asp y Gly54Asp;
- 5 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- 10 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- 15 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu, Arg105Gln; o
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,
- 20 en la preparación de un polipéptido bivalente.

Aspecto F-99: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 en la preparación de un polipéptido trivalente.

- 25 Aspecto F-100: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-99, en la preparación de una construcción trivalente que presenta preferiblemente unión intramolecular en comparación con unión intermolecular.

- 30 Aspecto F-101: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-100, como dominio de unión o unidad de unión en la preparación de un polipéptido trivalente, en el que los dominios de unión o unidades de unión se unen por medio de un conector de manera que el polipéptido trivalente presenta preferiblemente unión intramolecular en comparación con unión intermolecular y/o el polipéptido trivalente puede unirse simultáneamente a los tres sitios de unión en la proteína F de VRSh.

- 35 Aspecto F-102: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 60-76;

- 40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

- 45 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

- 50 en la preparación de un polipéptido trivalente.

Aspecto F-103: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-102, en el que las tres construcciones monovalentes son idénticas.

- 55 Aspecto F-104: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-102 o F-103, en el que las tres construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 60-76.

Aspecto F-105: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

- 60 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

- 65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición

78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

10 en la preparación de un polipéptido trivalente.

Aspecto F-106: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-105, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

15 a) SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

25 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido trivalente.

30 Aspecto F-107: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-105 o F-106, en el que las tres construcciones monovalentes son idénticas.

Aspecto F-108: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-107, en el que las tres construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 62, 65, 67, 68, 75 y 76.

35 Aspecto F-109: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

40 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

45 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y/o una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

50 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido trivalente.

55 Aspecto F-110: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-109, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 65 y 76;

60 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 65 y 76, siempre que:

65 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 54, una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78 y una arginina (Arg, R) en la posición 83 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o

superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

5 en la preparación de un polipéptido trivalente.

Aspecto F-111: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-109 o F-110, en el que las tres construcciones monovalentes son idénticas.

10 Aspecto F-112: Uso de tres construcciones monovalentes que consisten esencialmente en SEQ ID NO: 62 en la preparación de un polipéptido trivalente.

Aspecto F-113: Uso de tres construcciones monovalentes que consisten esencialmente en SEQ ID NO: 65 en la preparación de un polipéptido trivalente.

15 Aspecto F-114: Uso de tres construcciones monovalentes que consisten esencialmente en SEQ ID NO: 76 en la preparación de un polipéptido trivalente.

20 Aspecto F-115: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-153;

25 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

30 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

35 en la preparación de un polipéptido trivalente.

Aspecto F-116: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-115, en el que las tres construcciones monovalentes son idénticas.

40 Aspecto F-117: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-115 o F-116, en el que las tres construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-153.

45 Aspecto F-118: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

50 b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

55 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

60 en la preparación de un polipéptido trivalente.

65 Aspecto F-119: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-118, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

a) SEQ ID NO: 146-149 y 151-153;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108 y además arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y/o glutamina (Gln, Q) en la posición 105 de modo que cuando la secuencia de aminoácidos tiene una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente

10 no más de 1 aminoácido con:

- SEQ ID NO: 146, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

15 - SEQ ID NO: 147, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 148, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

20 - SEQ ID NO: 149, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83, ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85 y glutamina (Gln, Q) en la posición 105;

- SEQ ID NO: 151, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83;

25 - SEQ ID NO: 152, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

- SEQ ID NO: 153, la secuencia de aminoácidos tiene preferiblemente arginina (Arg, R) en la posición 83 y ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85;

30 (determinándose dichas posiciones según la numeración de Kabat); y

ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

35 en la preparación de un polipéptido trivalente.

40 Aspecto F-120: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-118 o F-119, en el que las tres construcciones monovalentes son idénticas.

Aspecto F-121: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-120, en el que las tres construcciones monovalentes consisten esencialmente en una de SEQ ID NO: 146-149 y 151-153.

45 Aspecto F-122: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, en la preparación de un polipéptido trivalente.

50 Aspecto F-123: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-122, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, en la preparación de un polipéptido trivalente.

55 Aspecto F-124: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-122, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido trivalente.

60 Aspecto F-125: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-122, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido trivalente.

65 Aspecto F-126: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-125, en el que la construcción

monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, en la preparación de un polipéptido trivalente.

5 Aspecto F-127: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido trivalente.

10 Aspecto F-128: Uso de tres construcciones monovalentes según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, en la preparación de un polipéptido trivalente.

15 Aspecto F-129: Uso de tres construcciones monovalentes según el aspecto F-122, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

20 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

25 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

30 - Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

35 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

40 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln;

45 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,

en la preparación de un polipéptido trivalente.

50 Aspecto F-130: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 62 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 77, en el que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 62 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 62, por medio de un conector 15GS.

55 Aspecto F-131: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 65 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 78, en el que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 65 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 65, por medio de un conector 15GS.

60 Aspecto F-132: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 76 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 79, en el que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 76 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 76, por medio de un conector 15GS.

65 Aspecto F-133: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 75 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 158, en el que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 75 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 75, por medio de un conector 15GS.

Aspecto F-134: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 147 en la preparación de un polipéptido

trivalente con SEQ ID NO: 159, en el que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 147 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 147, por medio de un conector 15GS.

5 Aspecto F-135: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 149 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 160, en el que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 149 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 149, por medio de un conector 15GS.

10 Aspecto F-136: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 153 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 161, en el que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 153 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 153, por medio de un conector 15GS.

Aspecto F-137: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que las construcciones monovalentes se eligen de las siguientes:

15 a) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1 (determinándose dicha posición según la numeración de Kabat); y

25 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual, aproximadamente igual o superior (midiéndose dicha afinidad mediante resonancia de plasmón superficial) y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual, aproximadamente igual o superior (tal como se define en el presente documento) en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

en la preparación de un polipéptido trivalente.

30 Aspecto F-138: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-137, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157.

35 Aspecto F-139: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

40 Aspecto F-140: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 62, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

45 Aspecto F-141: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 65, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

50 Aspecto F-142: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 76, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

55 Aspecto F-143: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 75, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

60 Aspecto F-144: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 147, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

65 Aspecto F-145: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 149, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

Aspecto F-146: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 153, en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

Aspecto F-147: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres,

cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

5 Aspecto F-148: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-147, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de una construcción trivalente.

10 Aspecto F-149: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-147, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ser19R, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

15 Aspecto F-150: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-147, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro o cinco) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

20 Aspecto F-151: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-150, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido: Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54D, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

25 Aspecto F-152: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres o cuatro) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

30 Aspecto F-153: Uso de una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-99 a F-101, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que uno o más (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu, y en la que el ácido glutámico en la posición 1 se cambia a ácido aspártico, en la preparación de un polipéptido trivalente.

35 Aspecto F-154: Uso de una construcción monovalente según el aspecto F-147, en el que la construcción monovalente consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5, en la que se han mutado los siguientes residuos de aminoácido:

40 - Glu1Asp;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

45 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

50 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

- Glu1Asp y Gly54Asp;

55 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

60 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

5 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o

- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln,

10 en la preparación de una construcción trivalente.

Aspecto F-155: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 138 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 142, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 138 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 5, por medio de un conector 15GS.

15

Aspecto F-156: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 139 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 143, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 139 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 62, por medio de un conector 15GS.

20

Aspecto F-157: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 140 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 144, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 140 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 65, por medio de un conector 15GS.

25 Aspecto F-158: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 141 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 145, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 141 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 76, por medio de un conector 15GS.

30 Aspecto F-159: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 154 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 162, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 154 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 75, por medio de un conector 15GS.

35 Aspecto F-160: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 155 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 163, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 155 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 147, por medio de un conector 15GS.

40 Aspecto F-161: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 156 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 164, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 156 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 149, por medio de un conector 15GS.

45 Aspecto F-162: Uso de una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 157 en la preparación de un polipéptido trivalente con SEQ ID NO: 165, en la que una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 157 se une a al menos dos secuencias de aminoácidos adicionales con SEQ ID NO: 153, por medio de un conector 15GS.

50 Aspecto E-262: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-261, que tiene una semivida aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, respectivamente.

55 Aspecto E-263: Polipéptido según el aspecto E-262, en el que una o más de otras unidades de unión dotan al polipéptido de semivida aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, respectivamente.

60 Aspecto E-264: Polipéptido según el aspecto E-262 o E-263, en el que dicha una o más de otras unidades de unión que dotan al polipéptido de semivida aumentada se elige del grupo que consiste en proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una parte de Fc, y proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas.

65 Aspecto E-265: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-262 a E-264, en el que dicha una o más de otras unidades de unión que dotan al polipéptido de semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en seroalbúmina humana o fragmentos de la misma.

Aspecto E-266: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-262 a E-265, en el que dicha una o más de otras unidades de unión que dotan al polipéptido de semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como

IgG).

- 5 Aspecto E-267: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-262 a E-266, en el que dicha una o más de otras unidades de unión que dotan al polipéptido de semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies[®] que pueden unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).
- 10 Aspecto E-268: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-262 a E-267, en el que dicha una o más de otras unidades de unión que dotan al polipéptido de semivida aumentada son un Nanobody[®] que puede unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).
- 15 Aspecto E-269: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-262 a E-268, que tiene una semivida sérica que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, respectivamente.
- 20 Aspecto E-270: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-262 a E-269, que tiene una semivida sérica que está aumentada en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, respectivamente.
- 25 Aspecto E-271: Polipéptido según cualquiera de los aspectos E-262 a E-270, que tiene una semivida sérica en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más; por ejemplo, de al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).
- 30 Aspecto G-1: Compuesto o construcción, que comprende o consiste esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 y/o uno o más Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 y/o uno o más polipéptidos según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, y opcionalmente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos por medio de uno o más conectores.
- 35 Aspecto G-2: Compuesto o construcción según el aspecto G-1, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de aminoácidos.
- 40 Aspecto G-3: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 o G-2, en el que dicho uno o más conectores, si están presentes, son una o más secuencias de aminoácidos.
- 45 Aspecto G-4: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-3, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de inmunoglobulina.
- 50 Aspecto G-5: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-4, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies[®].
- 55 Aspecto G-6: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-5, en el que dichas una o más secuencias de aminoácidos de la invención son secuencias de inmunoglobulina.
- 60 Aspecto G-7: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-6, en el que dichas una o más secuencias de aminoácidos de la invención se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies[®].
- 65 Aspecto G-8: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-7, que comprende o consiste esencialmente en uno o más Nanobodies[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, y

en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son Nanobodies®.

Aspecto G-9: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-8, que es una construcción multivalente.

5 Aspecto G-10: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-9, que es una construcción multiespecífica.

10 Aspecto G-11: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-10, que tiene una semivida aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody® según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, o polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271 *per se*, respectivamente.

15 Aspecto G-12: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-11, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión dotan al compuesto o construcción de semivida aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody® según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, o polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271 *per se*, respectivamente.

20 Aspecto G-13: Compuesto o construcción según el aspecto G-12, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que dotan al compuesto o construcción de semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una parte de Fc, y proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas.

25 Aspecto G-14: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-12 o G-13, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que dotan al compuesto o construcción de semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en seroalbúmina humana o fragmentos de la misma.

30 Aspecto G-15: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-12 a G-14, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que dotan al compuesto o construcción de semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

35 Aspecto G-16: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-12 a G-15, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que dotan al compuesto o construcción de semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un único dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpo de un único dominio, "dAb", secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies® que pueden unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

45 Aspecto G-17: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-12 a G-16, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que dotan al compuesto o construcción de semivida aumentada es un Nanobody® que puede unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

50 Aspecto G-18: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-11 a G-17, que tiene una semivida sérica que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody® según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, o polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271 *per se*, respectivamente.

55 Aspecto G-19: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-11 a G-18, que tiene una semivida sérica que está aumentada en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se* o Nanobody® según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, o polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271 *per se*, respectivamente.

60 Aspecto G-20: Compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-11 a G-19, que tiene una semivida sérica en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más; por ejemplo, de al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente al menos

aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

Aspecto M-1: Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos, que codifica una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-30 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-30 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, que es tal que puede obtenerse mediante la expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, o una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4.

Aspecto M-2: Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-1, que está en forma de una construcción genética.

Aspecto M-3: Uso de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-1, que codifica una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, para la preparación de una construcción genética que codifica un polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271.

Aspecto M-4: Uso de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-2, en el que la construcción genética codifica una construcción multivalente (tal como bivalente).

Aspecto N-1: Huésped o célula huésped que expresa, o que en circunstancias adecuadas es capaz de expresar, una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, o una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4; y/o que comprende un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-1 o M-2.

Aspecto O-1: Composición, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, o ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-1 o M-2.

Aspecto O-2: Composición según el aspecto O-1, que es una composición farmacéutica.

Aspecto O-3: Composición según el aspecto O-1 u O-2, que es una composición farmacéutica, que comprende además al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y que comprende opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

Aspecto P-1: Método para producir una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, o una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, o una composición según cualquiera de los aspectos O-1 a O-3, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) expresar, en una célula huésped u organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-1 o M-2,

opcionalmente seguido por:

b) aislar y/o purificar la secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, el Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, el polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, el compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, o la construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, así obtenido.

Aspecto P-2: Método para producir una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a K-271, un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, o una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, o una composición según cualquiera de los aspectos O-1 a O-3, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) cultivar y/o mantener un huésped o célula huésped según el aspecto N-1 en condiciones que son tales que dicho

huésped o célula huésped expresa y/o produce al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, o construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, o composición según cualquiera de los aspectos O-1 a O-3,

opcionalmente seguido por:

b) aislar y/o purificar la secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, el Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, el polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, el compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, o la construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4, o la composición según el aspecto O-1 a O-3, así obtenido.

Aspecto P-3: Método para preparar un polipéptido bivalente o trivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, comprendiendo dicho método al menos las etapas de unir dos o más secuencias de aminoácidos monovalentes o construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y, por ejemplo, uno o más conectores.

Aspecto P-4: Método según el aspecto P-3, que comprende las etapas de:

a) unir dos o más secuencias de ácido nucleico según el aspecto M-1, que codifican una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 (y también por ejemplo ácidos nucleicos que codifican uno o más conectores y además uno o más elementos de construcciones genéticas adicionales conocidos *per se*) para obtener una construcción genética según el aspecto M-2;

b) expresar, en una célula huésped u organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, la construcción genética obtenida en a)

opcionalmente seguido por:

c) aislar y/o purificar el polipéptido bivalente o trivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, así obtenido.

Aspecto Q-1: Método examinar secuencias de aminoácidos dirigidas contra proteína F de VRSh, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a. proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos;

b. examinar dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico para detectar secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos que puede unirse a y/o tiene afinidad por una proteína de la envoltura de un virus y que bloquea de manera cruzada o está bloqueando de manera cruzada un Nanobody[®] de la invención, por ejemplo una de SEQ ID NO: 60-76, 138-141 y 146-157 (tabla A-4), o un polipéptido o construcción que comprende al menos un Nanobody[®] de la invención, por ejemplo un polipéptido o construcción que comprende al menos una de SEQ ID NO: 77-99, 142-145 y 158-165 (véase la tabla A-5); y

c. aislar dicha secuencia de ácido nucleico, seguido por expresar dicha secuencia de aminoácidos.

Aspecto R-1: Método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-30 y W-1 a W-38, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y/o composición según los aspectos O-1 a O-3.

Aspecto R-2: Método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y asma, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y/o composición según los aspectos O-1 a O-3.

Aspecto R-3: Método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede

5 prevenirse y/o tratarse administrando, a un sujeto que lo necesita, una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y/o una composición según los aspectos O-1 a O-3, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y/o composición según los aspectos O-1 a O-3.

15 Aspecto R-4: Método para inmunoterapia, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y/o composición según los aspectos O-1 a O-3.

20 Aspecto R-5: Uso de una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, una construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y/o composición según los aspectos O-1 a O-3 en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh; y/o para su uso en uno o más de los métodos según los aspectos R-1 a R-4.

25 Aspecto R-6: Secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20, construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 y/o composición según los aspectos O-1 a O-3 para la prevención y/o el tratamiento de al menos una de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y asma.

35 Aspecto S-1: Parte o fragmento de una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, y/o un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271.

40 Aspecto S-2: Parte o fragmento según el aspecto S-1, que puede unirse específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o compite con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh.

45 Aspecto S-3: Parte de fragmento según cualquiera de los aspectos S-1 a S-2, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 1000 nM a 1 nM o menos, preferiblemente de 100 nM a 1 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM a 1 nM o menos.

50 Aspecto S-4: Parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-2 a S-3, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

55 Aspecto S-5: Parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-2 a S-4, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} de entre 10^{-2} s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-4} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-4} s^{-1} , o inferior.

60 Aspecto S-6: Compuesto o construcción, que comprende o consiste esencialmente en una o más partes o fragmentos según cualquiera de los aspectos S-1 a S-5, y opcionalmente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos por medio de uno o más conectores.

65 Aspecto S-7: Compuesto o construcción según el aspecto S-6, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de aminoácidos.

70 Aspecto S-8: Compuesto o construcción según el aspecto S-6 o S-7, en el que dicho uno o más conectores, si están presentes, son una o más secuencias de aminoácidos.

75 Aspecto S-9: Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos, que codifica una parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-1 a S-5 o un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos S-6 a S-8.

80 Aspecto S-10: Composición, que comprende al menos una parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-1

ES 2 643 034 T3

a S-5, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos S-6 a S-8, o ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto S-9.

5 Aspecto T-1: Derivado de una secuencia de aminoácidos según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 o de un Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38.

Aspecto T-2: Derivado según el aspecto T-1, que puede unirse específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o competir con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh.

10 Aspecto T-3: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-2, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

15 Aspecto T-4: Derivado según cualquiera de los aspectos T-2 a T-3, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

20 Aspecto T-5: Derivado según cualquiera de los aspectos T-2 a T-4, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} de entre 10^{-2} s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-4} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-4} s^{-1} , o inferior.

Aspecto T-6: Derivado de un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20 o un polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-271.

25 Aspecto T-7: Derivado según el aspecto T-6, que puede unirse específicamente al sitio antigénico II en la proteína F de VRSh y/o competir con Synagis[®] por la unión a la proteína F de VRSh.

30 Aspecto T-8: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 a T-7, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una constante de disociación (K_D) de 100 nM a 0,1 nM o menos, preferiblemente de 10 nM a 0,1 nM o menos, más preferiblemente de 1 nM a 0,1 nM o menos.

35 Aspecto T-9: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 a T-8, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{aso} de entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente de aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

40 Aspecto T-10: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 a T-9, que puede unirse específicamente a la proteína F de VRSh con una velocidad de k_{dis} de entre 10^{-2} s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-4} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-4} s^{-1} , más preferiblemente entre $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y 10^{-4} s^{-1} , o inferior.

45 Aspecto T-11: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 a T-10, que puede neutralizar VRSh, por ejemplo en un ensayo de microneutralización de la cepa de VRS Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6), con un valor de CI_{50} de entre 10 pM y 1000 pM, preferiblemente entre 10 pM y 250 pM, más preferiblemente entre 50 pM y 200 pM o menos.

50 Aspecto T-12: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 a T-11, que puede neutralizar VRSh, por ejemplo en un ensayo de microneutralización de la cepa de VRS Long (tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6), con un valor de CI_{50} que es al menos igual y preferiblemente mejor, al menos diez veces mejor, preferiblemente veinte veces mejor, más preferiblemente cincuenta veces mejor, incluso más preferiblemente sesenta, setenta, ochenta o más veces mejor en comparación con el valor de CI_{50} obtenido con Synagis[®].

55 Aspecto T-13: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-12, que tiene una semivida sérica que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se*, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-261, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20 *per se*, o construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 *per se*, respectivamente.

60 Aspecto T-14: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-13, que tiene una semivida sérica que está aumentada en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38 *per se*, Nanobody[®] según cualquiera de los aspectos B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38 *per se*, polipéptido según cualquiera de los aspectos E-1 a E-261, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos G-1 a G-20 *per se*, o construcción monovalente según cualquiera de los aspectos F-1 a F-4 *per se*, respectivamente.

65

- 5 Aspecto T-15: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-14, que tiene una semivida sérica en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más; por ejemplo, al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).
- 10 Aspecto T-16: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-15, que es un derivado pegilado.
- Aspecto T-17: Compuesto o construcción, que comprende o consiste esencialmente en uno o más derivados según cualquiera de los aspectos T-1 a T-16, y opcionalmente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos por medio de uno o más conectores.
- 15 Aspecto T-18: Compuesto o construcción según el aspecto T-17, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de aminoácidos.
- Aspecto T-19: Compuesto o construcción según el aspecto T-17 o T-18, en el que dicho uno o más conectores, si están presentes, son una o más secuencias de aminoácidos.
- 20 Aspecto T-20: Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos, que codifica un derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-16 o un compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos T-17 a T-19.
- 25 Aspecto T-21: Composición, que comprende al menos un derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-16, compuesto o construcción según cualquiera de los aspectos T-17 a T-19, o ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto T-20.
- 30 Aspecto U-1: Un método para administrar una cantidad eficaz de una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y/o una composición que comprende el mismo, en el que dicho método comprende la etapa de administrar la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, el Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, el compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o la construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y/o una composición que comprende el mismo al tejido pulmonar.
- 35
- 40 Aspecto U-2: El método según el aspecto U-1, en el que la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, el Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, el compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o la construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y/o una composición que comprende el mismo se administra mediante el uso de un inhalador, dispositivo de administración intranasal o aerosol.
- 45
- Aspecto U-3: Método según cualquiera de los aspectos U-1 o U-2, en el que al menos el 5%, preferiblemente al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, el 60%, el 70%, e incluso más preferiblemente al menos el 80% o más de la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, el Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, el compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o la construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y/o una composición que comprende el mismo es estable en el tejido pulmonar durante al menos 24 horas, preferiblemente al menos 48 horas, más preferiblemente al menos 72 horas.
- 50
- 55 Aspecto U-4: Método según cualquiera de los aspectos U-1 a U-3, en el que la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, el Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, el compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o la construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y/o una composición que comprende el mismo se aplican en forma pura, es decir, cuando son líquidos o un polvo seco.
- 60
- 65 Aspecto U-5: Método según cualquiera de los aspectos U-1 a U-3, en el que la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, el Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, el compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o la construcción

- 5 monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y/o una composición que comprende el mismo se administran al tejido pulmonar como composición o formulación que comprende una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y un portador adecuado para administración pulmonar.
- 10 Aspecto U-6: Composición farmacéutica que comprende una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y un portador adecuado para administración pulmonar.
- 15 Aspecto U-7: Dispositivo farmacéutico adecuado para la administración pulmonar de una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4 y/o adecuado en el uso de una composición que comprende el mismo.
- 20 Aspecto U-8: Dispositivo farmacéutico según el aspecto U-7 que es un inhalador para líquidos (por ejemplo una suspensión de partículas sólidas finas o gotitas) que comprende una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4.
- 25 Aspecto U-9: Dispositivo farmacéutico según el aspecto U-7 que es un aerosol que comprende una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4.
- 30 Aspecto U-10: Dispositivo farmacéutico según el aspecto U-7 que es un inhalador de polvo seco que comprende una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4 en forma de un polvo seco.
- 35 Aspecto U-11: Método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4 y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.
- 40 Aspecto U-12: Método para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas en el pulmón), neumonía, disnea, tos, sibilancias (recurrentes) y asma, comprendiendo dicho método administrar al tejido pulmonar de un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones A-1 a A-29, C-1 a C-38 y W-1 a W-38, un Nanobody[®] según cualquiera de las reivindicaciones B-1 a B-18, D-1 a D-38 y X-1 a X-38, un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones E-1 a E-271, un compuesto o construcción según cualquiera de las reivindicaciones G-1 a G-20 y/o una construcción monovalente según cualquiera de las reivindicaciones F-1 a F-4, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.
- 50 Aspecto V-1: Método para la prevención y/o el tratamiento de infección por VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.
- 60 Aspecto V-2: Uso de un polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo para la unión y/o neutralización de VRSh.
- 65

- Aspecto V-3: Uso de un polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo para la unión y/o neutralización de diferentes cepas de VRSh.
- 5 Aspecto V-4: Uso de un polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo para la unión y/o neutralización de uno o más mutantes de escape de un virus.
- Aspecto V-5: Método o uso según cualquiera de los aspectos V-1 a V-4, en el que el polipéptido multivalente es bivalente.
- 10 Aspecto V-6: Método o uso según cualquiera de los aspectos V-1 a V-4, en el que el polipéptido multivalente es trivalente.
- Aspecto V-7: Método o uso según cualquiera de los aspectos V-1 a V-6, en el que dicho polipéptido multivalente se administra según cualquiera de los métodos de las reivindicaciones U-1 a U-5 y/o U-11 a U-12.
- 15 Aspecto V-8: Método para la prevención y/o el tratamiento de infección por virus VRSh, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261 y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.
- 20 Aspecto V-9: Método según el aspecto V-8 en el que el compuesto o construcción multivalente se selecciona de la tabla A-5 (SEQ ID NO: 77-99, 138-141 y 146-157).
- 25 Aspecto V-10: Método según cualquiera de los aspectos V-8 o V-9, en el que se trata la infección mediante uno o más mutantes de escape de VRS.
- Aspecto V-11: Método según el aspecto V-10, en el que el mutante de escape es un mutante de escape específico para el sitio antigénico II.
- 30 Aspecto V-12: Uso de un compuesto o construcción multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo para la unión a y/o neutralización de uno o más mutantes de escape diferentes de VRS.
- 35 Aspecto V-13: Uso según la reivindicación V-12 en el que el mutante de escape es un mutante de escape específico para el sitio antigénico II.
- Aspecto V-14: Método según cualquiera de los aspectos V-8 o V-9, en el que se trata la infección mediante una o más cepas de VRSh.
- 40 Aspecto V-15: Método según el aspecto V-14, en el que la cepa de VRS es Long.
- Aspecto V-16: Método según el aspecto V-14, en el que la cepa de VRS es A-2.
- 45 Aspecto V-17: Método según el aspecto V-14, en el que la cepa de VRS es B-1.
- Aspecto V-18: Método según el aspecto V-14, en el que el polipéptido multivalente se une a y/o neutraliza la cepa de VRS Long y A-2.
- 50 Aspecto V-19: Método según el aspecto V-14, en el que el polipéptido multivalente se une a y/o neutraliza la cepa de VRS Long y B-1.
- Aspecto V-20: Método según el aspecto V-14, en el que el polipéptido multivalente se une a y/o neutraliza la cepa de VRS B-1 y A-2.
- 55 Aspecto V-21: Método según el aspecto V-14, en el que el polipéptido multivalente se une a y/o neutraliza la cepa de VRS Long, A-2 y B-1.
- Aspecto V-22: Uso de un compuesto o construcción multivalente según cualquiera de los aspectos E-7 a E-261, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo para la unión y/o neutralización de diferentes cepas de VRSh.
- 60 Aspecto V-23: Uso según el aspecto V-22, en el que las cepas de VRS son Long y A-2.
- 65 Aspecto V-24: Uso según el aspecto V-22, en el que las cepas de VRS son Long y B-1.

Aspecto V-25: Uso según el aspecto V-22, en el que las cepas de VRS son A-1 y B-1.

Aspecto V-26: Uso según el aspecto V-22, en el que las cepas de VRS son Long, A-2 y B-1.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunizaciones

10 Se inmunizaron dos llamas (156 y 157) según protocolos convencionales con 6 refuerzos de VRSh F_{TM}⁻ (forma sin anclaje a la membrana de la proteína de fusión, 70 kDa; Corral T. *et al.* 2007, BMC Biotechnol. 7: 17). Se extrajo sangre de estos animales 7 días tras el refuerzo 6 y 10 días tras el refuerzo 6.

15 Se inmunizaron dos llamas (212 y 213) por vía intramuscular en el cuello con 1 mg de la cepa de VRS de ARN inactivado long A (Hytest, Turku, Finlandia; #8RSV79), seguido por 4 refuerzos de 0,5 mg de VRS en un régimen bisemanal. Se inmunizaron dos llamas (206 y 207) por vía intramuscular con 1 mg de la cepa de VRS de ARN inactivado long A, se reforzaron con 0,25 mg de VRS tras 2 semanas, seguido por 3 refuerzos con 50 µg de VRSh F_{TM}-NN recombinante (forma sin anclaje a la membrana de la proteína de fusión, 70 kDa; Corral *et al.* 2007; BMC Biotechnol. 7: 17) en un régimen bisemanal. Para todas las inmunizaciones se prepararon los antígenos como emulsiones en aceite-PBS con Stimune como adyuvante. Se extrajo sangre de estos animales 4 días y 10 días tras la cuarta inmunización, mientras que también se tomó una biopsia de ganglios linfáticos 4 días tras la cuarta inmunización. Para el procedimiento de Nanoclone, se extrajeron 100 ml de sangre 11 días tras el refuerzo final de las llamas 206 y 207.

Ejemplo 2: Construcción de la biblioteca

25 Se prepararon células mononucleares de sangre periférica a partir de muestras de sangre usando Ficoll-Hypaque según las instrucciones del fabricante. A continuación, se extrajo el ARN total de estas células así como de las células de ganglios linfáticos del intestino y se usaron como material de partida para RT-PCR para amplificar fragmentos génicos que codifican Nanobody[®]. Se clonaron estos fragmentos en un vector de fagémido derivado de pUC119 que contiene el promotor LacZ, una secuencia codificante de proteína pIII de colfago, un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple y la secuencia líder gen3. En marco con la secuencia codificante de Nanobody[®], el vector codifica una etiqueta de c-myc y una etiqueta de (His)₆ C-terminales. Se preparó el fago según métodos convencionales y se almacenó a 4°C para su uso adicional, produciendo las bibliotecas de fagos 156, 157, 206, 207, 212 y 213.

Ejemplo 3: Selección de Nanobody[®] con la proteína F de VRSh

35 Para identificar Nanobodies[®] que reconocen la proteína de fusión de VRS, se usaron las bibliotecas 156, 157, 206, 207, 212 y 213 para la selección en F_{TM}-NN (forma sin anclaje a la membrana de la proteína de fusión Long, 70 kDa; Corral T. *et al.* 2007, BMC Biotechnol. 7: 17). Se inmovilizó la proteína F_{TM}⁻ (25 ng/pocillo) en placas para ELISA Nunc Maxisorp. Se incluyó un control con F_{TM}⁻ 0 µg/ml. Se eluyeron los fagos unidos de la F_{TM}⁻ usando tripsina y Synagis[®] (palivizumab, MedImmune, anticuerpo monoclonal humanizado, descrito en Zhao y Sullender 2005, J. Virol. 79: 3962) en la primera y segunda ronda de selecciones. Se usó Remicade (infiximab, anti-TNF; Centocor) como control para Synagis[®]. Se usó un exceso molar de 100 de Synagis[®] con el fin de identificar Nanobodies[®] que se unen específicamente al sitio de unión de Synagis[®] en VRS. Los resultados de la primera ronda de selecciones, eluidos con Synagis[®], se usaron para la segunda ronda de selecciones.

45 Además, se realizaron selecciones usando la cepa de VRSh Long inactivada (Hytest #8RSV79). Se inmovilizó la proteína F_{TM}-NN (25 ng/pocillo) o VRS (de 5 a 50 µg/pocillo) sobre placas para ELISA Nunc Maxisorp, junto a un control con antígeno 0 µg/ml. Se eluyeron los fagos unidos de la F_{TM}-NN usando tripsina, Synagis[®] (palivizumab, anticuerpo monoclonal humanizado, descrito en Zhao y Sullender 2005, J. Virol. 79: 396) o Fab de 101F (documento WO 06/050280, anticuerpo monoclonal humanizado) en la primera ronda de selección. Los resultados de la primera ronda de selecciones eluidos con Synagis[®] o Fab de 101F se usaron para la segunda ronda de selecciones, usando o bien Fab de Numax (motavizumab o MEDI-524, un producto de anticuerpo monoclonal humanizado de tercera generación evolucionado a partir de palivizumab; documento WO 06/050166), Synagis[®] o Fab de 101F para la elución. Se usó Remicade (infiximab, anti-TNF, véase también el documento WO 09/068625) como control para Synagis[®], mientras que Fab de Omnitarg (anti-Her2; producido internamente) sirvió como control para Fab de Numax y Fab de 101F. Se usó un exceso molar de 100 de Synagis[®], Fab de Numax o Fab de 101F con el fin de identificar Nanobodies[®] que se unen específicamente a los sitios antígenicos II o epítomos IV-VI en la proteína F de VRS. Para obtener Nanobodies[®] específicos para el sitio antígeno IV-VI, se realizó una segunda ronda de selecciones usando dos péptidos biotinilados: en primer lugar, un péptido que comprende los residuos 422-436 de la proteína F (Long) (Abgent, San Diego, CA) que abarca el epítipo de unión a 101F (Wu *et al.* 2007, J. Gen. Virol. 88: 2719-2723), en segundo lugar, un péptido que imita al epítipo de Mab19 (HWSISKPQ-PEG4-K-biotin) (Chargelegue *et al.* 1998, J. Virol. 72: 2040-2056).

65 Se analizaron los resultados de ambas rondas de selecciones para determinar el factor de enriquecimiento (fago

presente en eluato en relación con los controles). Basándose en estos parámetros, se eligieron las mejores selecciones para su análisis adicional. Se recogieron colonias individuales y se hicieron crecer en placas de 96 pocillos profundos (1 ml de volumen) y se indujeron añadiendo IPTG para la expresión de Nanobody[®]. Se prepararon extractos periplásmicos (volumen: ~ 80 µl) según métodos convencionales.

Para someter a prueba los clones seleccionados en los ensayos de neutralización de VRS, se purificaron parcialmente extractos periplásmicos de cultivos de 10 ml usando IMAC PhyTips (Phynexus Inc, San Jose, CA). En este caso, se cargaron 800 µl de extractos periplásmicos en columnas Phytips 200+ rellenas previamente con resina para cromatografía de afinidad por metal inmovilizado, seguido por elución de Nanobodies[®] etiquetados con His en 30 µl de glicina-HCl 0,1 M/NaCl 0,15 M (pH 3), tras lo cual se neutralizaron los eluatos con 5 µl de Tris-HCl 0,5 M, pH 8,5.

Ejemplo 4: Selección de Nanobody[®] con F_{TM}-NN de VRS usando la tecnología Nanoclone

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras de sangre usando Ficoll-Hypaque según las instrucciones del fabricante. Se aislaron linfocitos B específicos de antígeno que expresan anticuerpos de cadena pesada en su superficie, a partir de las PBMC por medio de clasificación por FACS (para una descripción de la tecnología Nanoclone se hace referencia al documento WO 06/079372). Para ello, se marcó la proteína F_{TM}-NN con colorante Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA; n.º de cat. A20000) y posteriormente se desaló para retirar el colorante Alexa Fluor 488 no conjugado residual según las instrucciones del fabricante.

Se tiñeron PBMC preinmunitarias (control de fondo) e inmunitarias de una llama con IgG1 conjugada con colorante fluorescente (inmunoglobulinas de cadena pesada+ligera convencionales), anticuerpos monoclonales murinos específicos de IgG2 e IgG3 (clases de inmunoglobulina de cadena pesada), anticuerpo DH59B marcado de manera fluorescente (CD172a) (VMRD, Inc. Pullman, WA; n.º de cat. DH59B; Davis *et al.* 1987, Vet. Immunol. Immunopathol. 15: 337-376) y antígeno marcado con Alexa 488. Se incluyó TOPRO3 como colorante discriminador de células vivas/muertas. Se separaron linfocitos B IgG1+, monocitos, neutrófilos y células muertas y por tanto se rechazaron de la clasificación. Los linfocitos B positivos para IgG2 o IgG3 específicos de antígeno (A488+) se clasificaron individualmente como células individuales en pocillos de placas para PCR independientes que contenían tampón para RT-PCR.

Para la llama 206, se obtuvo el 1,9% de células positivas para antígeno de la cantidad total de células vivas positivas para IgG2/IgG3 (el 1,0% en la muestra de referencia preinmunitaria), para la llama 207 se obtuvo el 4,2% de células positivas (el 0,7% en la muestra de referencia preinmunitaria). Se amplificaron genes de región variable de cadena pesada directamente a partir de estos linfocitos B mediante RT-PCR de células individuales y PCR anidada. Posteriormente se clonaron los productos de PCR en un vector de expresión adaptado para TOPO derivado de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple y la secuencia líder gen3. En marco con la secuencia codificante de Nanobody[®], el vector codificaba para una etiqueta de c-myc y una etiqueta de (His)₆ C-terminales. Se transformaron las construcciones clonadas en células de *Escherichia coli* TOP10 por medio de electroporación de alto rendimiento. Se hicieron crecer clones individuales en placas de 96 pocillos profundos (1 ml de volumen) y se indujeron añadiendo IPTG para la expresión de Nanobody[®]. Se prepararon extractos periplásmicos (volumen: ~ 80 µl) por medio de choque osmótico y se analizaron para determinar la unión a F_{TM}- en un ELISA de unión.

En resumen, se inmovilizaron 2 µg/ml de F_{TM}- directamente sobre placas de microtitulación Maxisorp (Nunc). Se bloquearon los sitios de unión libres usando Marvel al 4% en PBS. A continuación, se permitió que se unieran al antígeno inmovilizado 10 µl de extracto periplásmico que contenía Nanobody[®] de los diferentes clones en 100 µl de Marvel PBST al 2%. Tras la incubación y una etapa de lavado, se realizó la unión a Nanobody[®] usando un anticuerpo secundario de conejo anti-VHH (para las fracciones periplásmicas). Tras una etapa de lavado, se detectaron los Nanobodies[®] en las fracciones periplásmicas con un anticuerpo caprino contra las inmunoglobulinas del conejo conjugado con HRP. Se determinó la especificidad de unión basándose en los valores de DO en comparación con controles que no habían recibido Nanobody[®].

En total, se obtuvieron 8 agentes de unión a F_{TM}-NN positivos (4 de la llama 206, 4 de la llama 207) de los 52 VHH clonados.

Ejemplo 5: Examen de Nanobodies[®] que se unen al sitio antigénico II o IV-VI

Se analizaron extractos periplásmicos que contenían Nanobodies[®] individuales para determinar la unión al sitio antigénico II o IV-VI, usando un ensayo Alphascreen[®] (Perkin Elmer; Waltham, MA) (García-Barreno *et al.* 1989, J. Virol. 63: 925-932; Lopeze *et al.* 1998, J. Virol. 72: 6922-6928). En esta configuración, se unen a F_{TM}-NN simultáneamente Fab de Synagis[®] y 101F, permitiendo la detección de Nanobodies[®] que interfieren en la unión de cada uno de los sitios antigénicos II y IV-VI respectivos. En este caso, se añadieron extractos periplásmicos a proteína F_{TM}-NN (0,3 nM) y se incubaron durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron perlas aceptadoras conjugadas con Fab de 101F y Fab de Synagis[®] (0,3 nM) biotiniladas (10 µg/ml) y se incubó esta mezcla durante

1 hora. Finalmente se añadieron perlas donadoras recubiertas con estreptavidina (10 µg/ml) y tras 1 hora de incubación se leyó la placa en el lector de microplacas Envision. Se diluyeron los extractos periplásmicos 25 veces, lo que corresponde aproximadamente a una concentración final de 40 nM. Se validó el ensayo mediante la titulación de los competidores conocidos de Synagis[®], AcM 18B2 (Argene, Varilhes, Francia; 18042 N1902) y 2F7 (Abcam, Cambridge, R.U.; ab43812). También se analizaron Fab de Synagis[®], Fab de Numax y Fab de 101F, teniendo Fab de Numax el valor de CI₅₀ más bajo (8,6 E-11 M) seguido por Fab de Synagis[®] (5,97 E-10 M) y Fab de 101F (1,12 E-9 M). Para el examen de extractos periplásmicos (a una dilución 1/25) se usaron tanto Fab de Numax (40 nM) como Fab de 101F (40 nM) como controles positivos, mientras que extractos periplásmicos irrelevantes sirvieron como controles negativos. Se identificaron como coincidencia los clones que interferían en la unión a la proteína F_{TM}-NN en el ensayo Alphascreen[®] en más del 75% en relación con los controles negativos. En total se identificaron 341 coincidencias de 1856 clones, derivados de las 6 llamas pero la mayoría procedentes de las llamas 206 y 207. Además, de 8 clones obtenidos de las selecciones de Nanoclone 3 clones mostraron competencia.

Se sometió a deconvolución el sitio antigénico correcto (II o IV-VI) de los competidores por medio de un ELISA de competencia con Fab de Synagis[®] biotinilado (2 nM) o Fab de 101F biotinilado (3 nM) para determinar la unión a la proteína F_{TM}-NN (1 µg/ml). En resumen, se inmovilizó la proteína F_{TM}-NN en placas de microtitulación Maxisorp (Nunc) y se bloquearon los sitios de unión libres usando Marvel al 4% en PBS. Se diluyeron 1/10 los extractos periplásmicos y se mezclaron con el Fab biotinilado antes de la unión a la proteína F_{TM}-NN inmovilizada. Se incluyeron fracciones periplásmicas de control seleccionadas contra otras proteínas de la cubierta vírica. Se permitió que el anticuerpo competidor se uniera al antígeno inmovilizado con o sin Nanobody[®]. Tras la incubación y una etapa de lavado, se produjo la detección por medio de anticuerpos secundarios conjugados con Extravidin-HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; n.º de cat. E2886). Se determinó la especificidad de unión basándose en los valores de DO en comparación con controles que no recibieron Nanobody[®].

Se sometieron todas las coincidencias a análisis de secuencia y se clasificaron en familias según sus secuencias de CDR3 (véanse las tablas C-4 y A-1 en el documento WO 2009/147248).

Ejemplo 6: Examen de Nanobodies[®] neutralizantes de VRS

A partir de las seis bibliotecas de VRSh, se analizaron 163 secuencias únicas (160 identificadas a partir de bibliotecas de fagos, 3 derivadas de Nanoclone) para determinar la capacidad de neutralización de VRS Long en un ensayo de microneutralización como proteínas parcialmente purificadas. Se sembraron células Hep2 a una concentración de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio DMEM que contenía suero bovino fetal (FCS) al 10% complementado con penicilina y estreptomycin (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente) y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂. La reserva de virus usada se denomina cepa de VRSh long, Long LM-2 y Long M2 (usados de manera intercambiable) y es una reserva de virus derivada de ATCC VR-26 de la cual la secuencia de la proteína F corresponde a P12568 o M22643. La reserva de virus se ha sometido a pases varias veces a partir de la reserva de la ATCC. Se confirmó que la secuencia de la proteína F era idéntica a P12568 (véase el ejemplo 9). Se preincubó una cantidad convencional de la cepa de VRSh Long LM-2 con diluciones en serie de un volumen fijado de Nanobodies[®] purificados con Phytips (20 µl) en un volumen total de 50 µl durante 30 minutos a 37°C. Se reemplazó el medio de las células Hep2 por la premezcla para permitir la infección durante 2 horas, tras lo cual se añadieron 0,1 ml de medio de ensayo. Se realizó el ensayo en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 2,5% y penicilina y estreptomycin (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente). Se incubaron las células durante 72 horas adicionales a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂, tras lo cual se lavaron las células dos veces con Tween-20 al 0,05% en PBS y una vez con PBS solo, tras lo cual se fijaron las células con acetona fría al 80% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS (100 µl/pocillo) durante 20 minutos a 4°C y se dejaron secar completamente. A continuación, se detectó la presencia de la proteína F en la superficie celular en un ensayo de tipo ELISA. Para ello, se bloquearon las células Hep2 fijadas con disolución de seroalbúmina bovina (BSA) al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se incubaron durante 1 hora con Synagis[®] (2 µg/ml). Para la detección, se usó anticuerpo caprino contra la IgG humana, específico de fragmento F_C-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), tras lo cual se realizó el ELISA según procedimientos convencionales.

Además de los Nanobodies[®] neutralizantes de VRS identificados previamente 191D3 (SEQ ID NO: 9) y 192C4 (SEQ ID NO: 11), que se incluyeron como controles positivos en el examen, 5 clones del sitio antigénico II mostraron una fuerte actividad de neutralización de VRS Long: 1E4 (también denominado 207D1; SEQ ID NO: 1), 7B2 (SEQ ID NO: 2), NC23 (SEQ ID NO: 3), y dos miembros de la misma familia 15H8 (SEQ ID NO: 4) y NC41 (SEQ ID NO: 5) (tabla A-1). Ninguno de los Nanobodies[®] específicos de los sitios antigénicos IV-VI mostró más que una actividad de neutralización muy débil para la cepa de VRSh Long LM-2.

Ejemplo 7: Producción de Nanobodies[®] de VRSh

Además de los Nanobodies[®] neutralizantes de VRS identificados previamente 191D3 (SEQ ID NO: 9) y 191E4 (SEQ ID NO: 10), que se incluyeron como controles positivos en el examen, se expresaron cinco nuevos Nanobodies[®] neutralizantes seleccionados del examen descrito anteriormente (1E4, 7B2, 15H8, NC23 y NC41) así como 1

Nanobodies[®] del sitio antigénico IV-VI (15B3; SEQ ID NO: 7), se purificaron y caracterizaron adicionalmente. Para ello, volvieron a clonarse las secuencias codificantes en un vector de expresión derivado de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia para kanamicina, un sitio de clonación múltiple y la secuencia de péptido señal OmpA. En marco con la secuencia codificante de Nanobody[®], el vector codificaba para una etiqueta de c-myc y una etiqueta de (His)₆ C-terminales.

Se produjo expresión en células de *E. coli* TG-1 como proteínas etiquetadas con c-myc, His₆ en un volumen de cultivo de 1 l. Se indujo la expresión mediante la adición de IPTG 1 mM y se permitió que continuara durante 3 horas a 37°C. Tras centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplásmicos mediante congelación-descongelación de los sedimentos y resuspensión en dPBS. Se usaron estos extractos como material de partida para cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) usando columnas en bruto HisTrap FF (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se eluyeron los Nanobodies[®] de la columna con imidazol 250 mM y posteriormente se desalaron frente a dPBS.

Ejemplo 8: Caracterización de Nanobodies[®] de VRSh

Unión a proteína F en ELISA

Se mostró que todos los Nanobodies[®] purificados se unen a la proteína F en un ELISA de unión a proteína F_{TM}-NN y a VRSh. En la tabla B-1 se muestran los resultados para la unión a VRSh. En resumen, se inmovilizaron 1 µg/ml de F_{TM}-NN o 5 µg/ml de VRSh (Hytect Turku, Finlandia) directamente sobre placas de microtitulación Maxisorp. Se bloquearon los sitios de unión libres con caseína al 1%. Se permitió que diluciones en serie de Nanobodies[®] purificados se unieran al antígeno durante 1 hora. Se realizó la unión de Nanobody[®] usando un anticuerpo secundario de conejo anti-VHH, y detección final con un anticuerpo caprino anti-conejo conjugado con HRP. Se determinó la especificidad de unión basándose en los valores de DO en comparación con controles de Nanobody[®] irrelevantes.

Unión a proteína F en Biacore

Para determinar las afinidades de unión precisas de los Nanobodies[®] purificados, se realizó un análisis cinético usando un análisis por resonancia de plasmón superficial con la proteína F_{TM}-NN. Para la preincubación del chip sensor CM5, se dejó sobre el mismo la proteína VRSh F_{TM}- 10 µg/ml durante 120 segundos. Para la inmovilización mediante acoplamiento de amina, se usó EDC/NHS para la activación y etanolamina HCl para la desactivación (Biacore, kit de acoplamiento de amina). Se añadió Synagis[®] 100 nM y luego 100 nM de los Nanobodies[®]. Se realizó la evaluación de las velocidades de disociación ajustando un modelo de interacción 1:1 (modelo de unión de Langmuir) mediante el software Biacore T100 v1.1. En la tabla B-1 se muestran las velocidades de disociación y las constantes de afinidad.

Competencia con Synagis[®]

Se determinó la capacidad de Nanobodies[®] purificados para competir con el AcM Synagis[®] o Fab de Synagis[®] biotilado por la unión a F_{TM}-NN en ELISA de competencia siguiendo el procedimiento tal como se describe esencialmente en el ejemplo 5. La figura 1 muestra un ejemplo representativo de un ELISA de competencia en el que Nanobodies[®] purificados compiten con Fab de Synagis[®] biotilado por la unión a F_{TM}-NN. En la tabla B-1 se resumen los valores de CE₅₀.

Ejemplo 9: Microneutralización *in vitro* de distintas cepas de VRSh

Se sometió a prueba la potencia de Nanobodies[®] purificados en la neutralización de diferentes cepas de VRS de tipo A y B mediante el ensayo de microneutralización *in vitro* (véase el ejemplo 6). Se prepararon reservas víricas de VRS Long LM-2 (n.º de registro P12568; ATCC VR-26), VRS A-2 (ATCC VR-1540; n.º de lote 3199840) y VRS B-1 (ATCC VR-1580; n.º de lote 5271356) en células Hep2 y se titularon posteriormente para determinar la dosis infecciosa óptima para su uso en el ensayo de microneutralización. En la tabla B-1 se muestran los resultados de las potencias de neutralización de los diferentes Nanobodies[®] purificados. Mientras que los seis Nanobodies[®] que reconocen el epítipo de Synagis[®] pudieron neutralizar eficazmente las cepas de tipo A Long y A-2, no pudieron neutralizar la infección con la cepa B-1 o lo hicieron a concentraciones > 1 µM. Los competidores de 101F, 15B3 y 191E4 mostraron una potencia de neutralización muy débil con la cepa B-1 sólo cuando se administraban a concentraciones de µM.

Se verificaron las secuencias de las proteínas F respectivas de las diferentes cepas de VRS por medio de PCR de transcriptasa inversa y análisis de secuencia posterior. En resumen, se aisló el ARN total de células Hep2 infectadas por VRS usando el kit RNeasy mini (Qiagen, Venlo, Países Bajos), tras lo cual se preparó ADN complementario usando el kit de transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se amplificó la proteína F de las cepas de VRS A y se secuenció usando los cebadores descritos en Kimura *et al.* 2004 (Antiviral Research 61: 165-171). Para la amplificación de la proteína F de la cepa de VRS B-1 se usaron los siguientes cebadores:

FB1_outer_for: cttagcagaaaccgtga (SEQ ID NO: 13); FB1_outer_rev: tgggttgattgggattg (SEQ ID NO: 14); FB1_seq_1123-for: ggactgatagaggatggta (SEQ ID NO: 15); FB1_seq_1526-rev: gctgactcacttggtaa (SEQ ID NO: 16). La secuencia de la cepa de VRS B-1 correspondía al n.º de registro P13843, con una mutación puntual adicional Ser540Leu. La secuencia para la cepa de VRS Long M2 correspondía completamente a la secuencia notificada (n.º de registro M22643). La secuencia para la cepa de VRS A-2 correspondía al n.º de registro M11486. Véase también la tabla A-2.

Ejemplo 10: Construcción, producción y caracterización de Nanobodies® de VRSh multivalentes

Se generaron construcciones de Nanobody® multivalentes conectadas por conectores de Gly-Ser de diferentes longitudes y composición por medio de reacciones de PCR independientes (1 para la subunidad de Nanobody® N-terminal, 1 para la central (en el caso de trivalente) y 1 para la subunidad C-terminal) usando diferentes conjuntos de cebadores que abarcan sitios de restricción específicos. De manera similar, se generaron construcciones multivalentes conectadas por un conector de Ala-Ala-Ala. Se clonaron todas las construcciones en un vector de expresión derivado de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia para kanamicina, un sitio de clonación múltiple y la secuencia de péptido señal OmpA. En marco con la secuencia codificante de Nanobody®, el vector codificaba una etiqueta de c-myc y una etiqueta de (His)6 C-terminales. En el caso de que estuviera presente un conector de 35 Gly-Ser en la construcción multivalente, se usó un vector de expresión derivado de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia para kanamicina y la secuencia de péptido señal OmpA. Directamente en el sentido de 3' del péptido señal estaba presente un sitio de clonación múltiple para la inserción de Nanobody®, seguido por una secuencia de ADN que codificaba un conector de 35Gly-Ser y un segundo sitio de clonación múltiple para la clonación de una segunda secuencia de Nanobody®. En marco con la secuencia codificante del Nanobody®-35Gly-Ser-Nanobody® resultante, el vector codificaba una etiqueta de c-myc y una etiqueta de (His)6 C-terminales. La tabla B-2 enumera las construcciones multivalentes generadas con Nanobodies® específicas de VRS. En la tabla A-3 se muestran las secuencias de las construcciones multivalentes.

Se expresaron construcciones de Nanobody® de VRS multivalentes, se purificaron y se caracterizaron adicionalmente. Se realizó la producción en células de *E. coli* TG1, seguido por purificación a partir de la fracción periplásmica por medio de la etiqueta de His mediante IMAC y desalación, esencialmente tal como se describe en el ejemplo 7. Para determinadas construcciones trivalentes (por ejemplo RSV401, RSV404, RSV406) se realizó la producción en *P. pastoris* seguido por purificación a partir de la fracción de medio. Todos los Nanobodies® trivalentes se sometieron a filtración en gel como etapa final para retirar posibles productos de degradación bivalentes y monovalentes.

Se confirmó la unión de Nanobodies® multivalentes purificados a la proteína F de VRSh en ELISA tanto en proteína F_{TM-} como en VRSh (véase el ejemplo 8). Para la mayoría de los Nanobodies® el cambio de formato a construcciones bivalentes y trivalentes dio como resultado un efecto de avidéz claro pero limitado (aumento de hasta 10 veces), con la excepción de las construcciones multivalentes de 7B2 y NC23 que mostraron valores de CE₅₀ similares a los de sus homólogos monovalentes (tal como se muestra para 7B2 en la figura 2).

Ejemplo 11: Potencia de construcciones bi y trivalentes para neutralizar VRSh

Se evaluó la potencia de las construcciones de Nanobody® en el ensayo de neutralización de VRS con diferentes cepas de VRS (véanse los ejemplos 6 y 9). Nanobodies® bivalentes que se unen al sitio antigénico II mostraron aumentos marcados en las potencias de 100 a 1000 veces (es decir, mucho más altos que el aumento de afinidad) en la neutralización de Long en relación con sus homólogos monovalentes, con valores de CI₅₀ que oscilaban entre 50-380 pM, que son mejores o similares a Fab de Numax. Sin embargo, en las cepas de VRS B-1, el aumento de potencia fue mucho menos intenso, y ninguna de las construcciones diméricas era más potente que Synagis®. Sorprendentemente, esto pudo superarse mediante la generación de construcciones trivalentes, tal como se muestra en la figura 3. Las construcciones trivalentes con tres Nanobodies® que se unen al sitio antigénico II eran neutralizadoras al menos 1000 veces más potentes en las cepas de VRS B-1 que sus homólogos monovalentes.

Ejemplo 12: Reactividad de Nanobodies® monovalentes con mutantes de escape de la cepa Long

Se seleccionaron varios mutantes de escape, descritos en Lopez *et al.* 1998 (J. Virol. 72: 6922-6928), y específicos para el sitio antigénico II (R47F/4, R47F/7, RAK13/4, R7C2/11, R7C2/1) o IV-VI (R7.936/1, R7.936/4, R7.936/6, R7.432/1) o la combinación de ambos (RRA3), para someter a prueba su reactividad con 10 Nanobodies® monovalentes, incluyendo el Nanobody® 191C7 (SEQ ID NO: 8) que se identificó previamente que no se une a los sitios antigénicos II o IV-VI.

Se realizó este ensayo según Lopez *et al.* 1998 (J. Virol. 72: 6922-6928). En resumen, se sometió a prueba cada Nanobody® a 0,2 µg/ml en ELISA usando extractos de antígeno de células HEp-2 infectadas con los diferentes mutantes de escape. Se normalizaron los resultados de absorbancia para la reactividad en la cepa de virus de referencia (Long de tipo natural) así como en el Nanobody® de control 191C7. En la tabla B-3 se muestran los resultados.

Una reactividad de >75% se indica como un cuadrado negro relleno, los cuadrados con sombreado oscuro corresponden a una reactividad de entre el 75 y el 50%, los cuadrados con sombreado claro corresponden a una reactividad del 25-50% y una reactividad de menos del 25% se indica mediante un cuadrado en blanco. En general se encontró que los Nanobodies[®] ya identificados previamente como agentes de unión al sitio antigénico II (192C4, 191D3, 191F2, NC23, 15H8, 7B2 y NC41) eran sensibles a mutaciones típicas en sitio antigénico II, mientras que los otros Nanobodies[®] ya identificados como agentes de unión al sitio antigénico IV-VI eran de hecho sensibles a mutaciones en estos sitios.

Ejemplo 13: Reactividad de Nanobodies[®] multivalentes con mutantes de escape de la cepa Long

Posteriormente se analizaron varias construcciones multivalentes en un panel limitado panel de virus de escape para evaluar la unión. Se realizó este ensayo según Lopez *et al.* 1998 (J. Virol. 72: 6922-6928). En resumen, se sometió a prueba cada Nanobody[®] a 0,1 µg/ml para Nanobodies[®] monovalentes y a 0,05 µg/ml para Nanobodies[®] bi y trivalentes en ELISA usando extractos de antígeno de células HEp-2 infectadas con los diferentes mutantes de escape. Se normalizaron los resultados de absorbancia para la reactividad en la cepa de virus de referencia (Long de tipo natural) así como en el Nanobody[®] de control (191E4; SEQ ID NO: 10, en este ensayo particular). En la tabla B-4 se muestran los resultados.

Una reactividad de >75% se indica como un cuadrado negro relleno, los cuadrados con sombreado oscuro corresponden a una reactividad de entre el 75 y el 50%, los cuadrados con sombreado claro corresponden a una reactividad del 25-50% y una reactividad de menos del 25% se indica mediante un cuadrado en blanco. De manera notable, las construcciones multivalentes mostraron una unión mejorada en comparación con su homóloga monovalente, al virus mutante R7C2/11. Además la construcción biparatópica RSV403 no era sensible a ninguno de los mutantes.

Ejemplo 14: Neutralización de mutantes de escape de la cepa Long por Nanobodies[®] multivalentes

En los ejemplos 12 y 13, se ha descrito la unión de Nanobodies[®] monovalentes a mutantes de escape de VRS con sitios antigénicos II y/o IV-VI típicos. La unión de Nanobodies[®] que reconocen específicamente estos sitios antigénicos casi se perdió o se redujo significativamente. El cambio de formato de estos Nanobodies[®] a construcciones bi o trivalentes restauró parcialmente la actividad de unión pero no para los tres virus mutantes de escape. La unión al mutante de escape R7C2/1 (mutación K272E en el sitio antigénico II) permaneció por debajo del nivel del 25% para cualquier construcción bi o trivalente que consistía únicamente en los Nanobodies[®] que se unen al sitio antigénico II. Los Nanobodies[®] 15B3 y 191E4, que se unen al sitio antigénico IV-VI, fueron los únicos Nanobodies[®] (como tales o en construcciones biparatópicas) capaces de unirse a este mutante a un nivel del 75% o más.

Un análisis más detallado de los datos indicó que la unión a R7C2/1 aumentó ligeramente cuando aumentó la valencia del Nanobody[®]. La unión de las construcciones 7B2 era del 0, el 4,4 y el 13% respectivamente para los formatos monovalente, bivalente (RSV106) y trivalente (RSV400). Se espera que un nivel tan bajo de unión residual dé como resultado una pérdida de potencia muy alta para neutralizar VRS.

Se evaluó la potencia de neutralización de Nanobodies[®] en el mismo conjunto seleccionado de mutantes de escape tal como se describió en el ejemplo 13. Para este fin, se compararon los Nanobodies[®] monovalentes 7B2, 15H8 y NC41 con sus homólogos trivalentes respectivos, RSV400, RSV 404 y RSV 407. Obsérvese que en el ejemplo 13 sólo se evaluó RSV400 para determinar la unión a estos mutantes de escape. Además también se analizó la molécula trivalente biparatópica RSV403 (7B2-15B3-7B2) para determinar su capacidad de neutralización.

Se realizó el ensayo de microneutralización de VRSh esencialmente tal como se describió en el ejemplo 6. En resumen, se sembraron células Hep2 a una concentración de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio DMEM que contenía suero bovino fetal (FCS) al 10% complementado con penicilina y estreptomina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente) y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂. Se prepararon reservas víricas de diferentes virus en células Hep2 y posteriormente se titularon para determinar la dosis infecciosa óptima para su uso en el ensayo de microneutralización. Se preincubó una cantidad convencional de la cepa de VRSh específica con diluciones en serie de Nanobodies[®] purificados en un volumen total de 50 µl durante 30 minutos a 37°C. Se reemplazó el medio de las células Hep2 por la premezcla para permitir la infección durante 2 horas, tras lo cual se añadieron 0,1 ml de medio de ensayo. Se realizó el ensayo en medio DMEM complementado con suero de ternero fetal al 2,5% y penicilina y estreptomina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente). Se incubaron las células durante 72 horas adicionales a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂, tras lo cual se lavaron las células dos veces con Tween-20 al 0,05% en PBS y una vez con PBS solo, tras lo cual se fijaron las células con acetona fría al 80% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS (100 µl/pocillo) durante 20 minutos a 4°C y se dejaron secar completamente. A continuación, se detectó la presencia de la proteína F en la superficie celular en un ensayo de tipo ELISA. Para ello, se bloquearon las células Hep2 fijadas con disolución de albúmina sérica porcina al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se incubaron durante 1 hora con suero de conejo policlonal anti-proteína F (Corral *et al.* 2007, BMC Biotechnol. 7: 17) o Synagis[®] (2 µg/ml). Para

la detección se usaron anticuerpos caprinos anti-conejo conjugados con HRP o anticuerpo caprino contra la IgG humana, específico de fragmento Fc γ -HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), tras lo cual se realizó el ELISA según procedimientos convencionales.

5 Tal como se muestra en las figuras 4A-C, los Nanobodies[®] monovalentes casi no tenían potencial de neutralización hacia los virus mutantes de escape del sitio antigénico II R7C2/11 y R7C2/1. La potencia para neutralizar la variante de sitio antigénico IV-VI R7.936/4 era comparable a la potencia para neutralizar la cepa Long de tipo natural. Estos datos están en línea con los datos de unión del ejemplo 12 y el mapeo de epítomos tal como se describió para estos Nanobodies[®] en el ejemplo 5.

10 Sin embargo, las construcciones de Nanobody[®] trivalentes neutralizaron de manera potente los 3 mutantes de escape (figuras 4D-G). Se observó una inhibición máxima a concentraciones de tan sólo aproximadamente 20 nM mientras que este nivel de inhibición no se observó para los Nanobodies[®] monovalentes a concentraciones de hasta 2 μ M. La neutralización potente de R7C2/1, casi equivalente a la neutralización de R7C2/11, es lo más sorprendente
15 puesto que el ejemplo 13 mostró una pérdida muy significativa de actividad de unión para la molécula trivalente RSV400 que se esperaba que diese como resultado una pérdida muy alta de potencia de neutralización. La IgG bivalente Synagis[®] palivizumab, que también reconoce el sitio antigénico II no fue capaz de bloquear la replicación de R7C2/1 o R7C2/11 significativamente a concentraciones de aproximadamente 0,2 μ M. A esta concentración no se alcanzó una CI₅₀ mientras que R7.936/4 y virus Long de tipo natural se neutralizaron con una CI₅₀ de unos pocos
20 nM (datos no mostrados).

Ejemplo 15: Análisis de impacto de la longitud del conector sobre la potencia de construcciones trivalentes de NC41

25 Para determinar el impacto de la longitud del conector de construcciones trivalentes de NC41, se generaron diferentes construcciones con conectores que oscilaban entre conectores de 3Ala, 9GS, 15GS a 20GS (RSV408, RSV409, RSV407 y RSV410 resp.). Las cuatro construcciones trivalentes de NC41 fueron capaces de neutralizar completamente las cepas de VRS tanto B-1 como Long (figura 5). No se observó ningún efecto de la longitud del conector en la neutralización de VRS Long, ya que todas las construcciones tenían una potencia igual. En cambio, las construcciones con conectores 9GS y 3Ala tenían valores aumentados de CI₅₀ con la cepa B-1, indicando que se
30 requiere una longitud del conector mínima de 15GS para lograr una potencia máxima. Esto puede explicarse mediante la observación de que las construcciones de NC41 bivalentes ya eran neutralizadoras muy potentes con Long, mientras que con la cepa B-1 la diferencia de potencia entre NC41 bivalente y trivalente es mucho mayor (véase el ejemplo 11). En RSV408 y RSV409, la accesibilidad del Nanobody[®] central puede ser menos óptima.

Ejemplo 16: Humanización del Nanobody[®] NC41

35 Se alineó la secuencia del Nanobody[®] NC41 con VH3-23 de línea germinal humana para permitir la selección de residuos adecuados para la humanización adicional de la secuencia del Nanobody[®]. Además, se realizó un análisis informático para identificar residuos que son potencialmente propensos a modificaciones postraduccionales, tales como isomerización de Asp, y para identificar mutaciones que mejorarían la estabilidad química. Se excluyeron de la
40 modificación las regiones CDR y los denominados residuos distintivos, que se sabe que son esenciales para la estabilidad y potencia de Nanobodies[®].

45 Para NC41 se seleccionaron en total 11 posiciones para la mutación al residuo humano correspondiente: Se introdujeron simultáneamente cuatro mutaciones (Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gln108Leu), ya que no se esperaba que estos residuos afectaran drásticamente a la función del Nanobody[®] (basándose en datos de otros Nanobodies[®]). En esta variante básica, se mutaron siete residuos de los cuales se desconocía si la mutación al homólogo humano estaba permitida (Ser19Arg, Ile20Leu, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln) usando un enfoque de biblioteca, permitiendo o bien el aminoácido de tipo natural o bien el aminoácido humano correspondiente en cada
50 posición. La biblioteca resultante, con una diversidad teórica de 128, se generó mediante ensamblaje génico usando secuencias oligonucleotídicas solapantes que contenían un uso de codones degenerado, y se clonaron posteriormente en un vector de expresión derivado de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia para kanamicina, un sitio de clonación múltiple y la secuencia líder OmpA. En marco con la secuencia codificante de Nanobody[®], el vector codificaba una etiqueta de c-myc y una etiqueta de (His)₆ C-terminales. Se produjeron
55 Nanobodies[®] en el periplasma de *E. coli* (véase el ejemplo 7). Se confirmó la diversidad de la biblioteca mediante análisis de secuencia.

60 Se generaron extractos periplásmicos a partir de 368 variantes de NC41 individuales y NC41 de tipo natural y se sometieron a una cascada de exámenes funcionales para identificar la variante de NC41 humanizada mejor, en cuanto a tanto potencia como estabilidad. En una primera etapa, se determinó la unión a VRS de variantes de NC41 humanizadas a VRS Long en ELISA (Hytest, Turku, Finlandia; #8RSV79) (véase el ejemplo 8).

65 Además, se analizaron los agentes de unión positivos para determinar la unión a células Hep2 infectadas con la cepa de VRS B-1. En este caso, se sembraron células Hep2 en placas de 96 pocillos y se infectaron con la cepa de VRS B-1, esencialmente siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de neutralización (véase el ejemplo 6). Tres días más tarde se fijaron las células con acetona enfriada con hielo y se usaron las placas en un ensayo ELISA

usando extractos periplásmicos a diferentes diluciones. Se detectó un Nanobody[®] que se une a células infectadas Hep2-B1 usando anticuerpo policlonal de conejo anti-VHH, seguido por anticuerpos caprinos anti-conejo conjugados con HRP, tras lo cual se realizó el ELISA según procedimientos convencionales.

5 Adicionalmente, con el fin de verificar si las mutaciones introducidas afectaban a la estabilidad frente a la temperatura, se calentaron extractos periplásmicos de todos los agentes de unión hasta 74°C durante 2 horas, que es 5°C por encima de la temperatura de fusión de NC41 de tipo natural. Se analizó en ELISA la unión a VRS long antes y después del calentamiento, y se tomó la razón de señal de unión después del calentamiento frente a antes como una medida de la estabilidad frente a la temperatura.

10 Finalmente, se determinaron las velocidades de disociación cinéticas de las variantes en un ensayo Biacore con la proteína F_{im}-NN, tal como se describe en el ejemplo 8.

15 Se secuenciaron todos los agentes de unión y se clasificaron según su capacidad para unirse a la proteína F de VRS. Cuando se analizaron las secuencias de los agentes de unión más fuertes, se observó en todos los casos una clara preferencia por Gln105 (residuo humano). Mientras que la mutación Ile20Leu parecía estar subrepresentada, para todas las demás posiciones no había una preferencia clara por o bien la secuencia de tipo natural o bien la secuencia humana, con variantes que contenían hasta 10 mutaciones en comparación con NC41 de tipo natural. Notablemente, en una variante se observó una mutación puntual adicional (Gly54Asp) dentro de la región CDR2.

20 Esta variante, variante 6 de NC41, mostró la velocidad de disociación más baja de todas las variantes y NC41 de tipo natural, dando como resultado un aumento de afinidad.

25 Basándose en los datos de secuencia y funcionales, se seleccionaron 18 variantes (tabla A-4) para su caracterización adicional como proteínas purificadas (figuras 6 y 7). Se produjeron y se purificaron todas las variantes, y se determinaron las potencias para la neutralización de VRS Long y B-1 en el ensayo de microneutralización. Mientras que la mayoría de las variantes mostraron una actividad muy similar a NC41 de tipo natural, varias variantes mostraron una potencia aumentada tanto con Long (2 veces) como con B-1 (6 veces), siendo los neutralizadores más fuertes las variantes 6, 8, 9, 17 y 18 de NC41. Notablemente, la variante 18 estaba humanizada de manera máxima en las 11 posiciones, con la introducción adicional de Asp54 en la región CDR2. Las

30 variantes 10 y 11 eran más potentes en la neutralización de la cepa B-1 que NC41, pero no con la cepa Long.

Para un panel selecto de variantes de NC41, se determinaron los parámetros de unión cinéticos en Biacore con la proteína F_{im}-NN (tabla B-5) tal como se describe en el ejemplo 8. No se observaron diferencias significativas en los datos calculados para NC41 y las variantes 6, 8 y 17 de NC41 humanizadas. Debe indicarse que las velocidades de asociación de todas las variantes de NC41 estaban en el límite de detección del instrumento, pero las velocidades de disociación pudieron clasificarse como $v_{06} < v_{17} < NC41 < v_{08}$. El impacto de la mutación de Gly a Asp en CDR2 (posición 54) pudo demostrarse claramente comparando v_{17} y v_{18} ya que ésta es la única diferencia en estas variantes humanizadas de manera máxima. Se sometió a prueba la neutralización tanto para la cepa Long como la cepa B-1 en dos ensayos independientes en comparación con NC41 de tipo natural tal como se muestra en la tabla

35 B-5. En ambos ensayos NC41v18 era más potente que NC41 con ambos virus y en ambos ensayos NC41v18 era más potente que NC41v17 con la cepa Long. También se observó la neutralización mejorada de NC41v18 para la cepa B-1 en el segundo ensayo.

45 Se sometieron todas las variantes de NC41 a desplegamiento inducido por calor para evaluar el efecto de las mutaciones introducidas sobre la estabilidad de la proteína. Para ello se determinó la temperatura de fusión (T_m) mediante un aumento gradual de la temperatura en presencia de Sypro Orange, un colorante que se une a residuos de Trp que quedan expuestos tras el desplegamiento de la proteína. Todas las variantes mostraron que tenían una T_m aumentada en relación con NC41 de tipo natural (69°C), hasta 9°C para la variante 18.

50 Ejemplo 17: Optimización de secuencia adicional de NC41 para la expresión

Se analizó adicionalmente la secuencia de Nanobody[®] NC41 con el objetivo de optimizar la expresión en *Pichia pastoris*. Se diseñaron las variantes 19-26 de NC41 combinando posiciones humanizadas que se mostró que estaban permitidas sin pérdida de potencia en el ensayo de microneutralización (ejemplo 16). Se introdujeron

55 simultáneamente cuatro mutaciones (Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu), mientras que se examinaron tres mutaciones tanto individualmente como en cada posible combinación examinada (Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln) (véase la tabla A-4). Se clonaron todas las construcciones en un vector de expresión y se introdujeron en la cepa de *Pichia pastoris* XL-33, tras lo cual se evaluó el número de incorporaciones en el genoma de *Pichia* mediante PCR cuantitativa en tiempo real. A partir de cada construcción se seleccionaron un clon con 1-2 copias y otro con cuatro o

60 más copias para producciones a pequeña escala, y se estimó el rendimiento de expresión de variantes de NC41 en relación con el tipo natural mediante electroforesis en gel en geles de SDS-PAGE. Las variantes 20, 22, 24, 25 y 26 de NC41 mostraron la expresión más alta, con niveles de expresión similares a NC41 de tipo natural todavía con un bajo número de copias.

65 Volvieron a clonarse las variantes 22 y 26 de NC41 en un vector de expresión para *E. coli* para determinar la producción y purificación de Nanobodies etiquetados con Myc-His (véase el ejemplo 7). Se sometió a prueba la

potencia de ambas variantes para la neutralización de VRS Long en el ensayo de microneutralización, tal como se describió en el ejemplo 6. Ambas variantes eran igual de potentes que NC41 de tipo natural (CI₅₀ de 126 y 310 nM para v22 y v26, respectivamente).

5 Ejemplo 18: Optimización de secuencia de RSV407 para la estabilidad química

10 Durante la producción de los Nanobodies y polipéptidos de la invención, se observó piroglutamato (pGlu) en el extremo amino-terminal (por medio de RP-HPLC). Se detectaron niveles de más del 15% de pGlu tras la fermentación y el nivel de pGlu aumentó regularmente en almacenamiento durante estudios de estabilidad. Por tanto, se cambió el glutamato (E) N-terminal a aspartato (D). Esto eliminaría la posibilidad de modificación postraduccional de pGlu del extremo N-terminal y por tanto conduciría a una estabilidad de producto aumentada.

15 La secuencia de aminoácidos de la variante de Nanobody[®] de secuencia optimizada se facilita en la tabla A-5 (RSV434; SEQ ID NO: 142) respectivamente. Para la producción de este Nanobody[®], se desarrolló un sistema de expresión en *Pichia* basándose en el sistema disponible comercialmente de Invitrogen usando X-33 como cepa huésped. El sistema hace uso del promotor AOX1 para dirigir la producción del Nanobody[®] y usa el péptido de secreción de apareamiento alfa para la secreción del Nanobody[®] al medio.

20 Se analizó RSV434 de secuencia optimizada para determinar los niveles de expresión, por medio de RP-HPLC, SE-HPLC y se comparó con la molécula original (RSV407) con respecto a la neutralización de VRS.

No hubo ninguna diferencia significativa en el nivel de expresión en comparación con RSV407 y los clones tanto de bajo como de alto número de copias producían más de 1 g/l de medio clarificado (libre de células).

25 Se capturaron muestras de un ml en una columna MEP Hypercel de 1 ml, se eluyeron y se analizaron por medio de SE-HPLC y RP-HPLC. El análisis por SE-HPLC mostró material monomérico, mientras que el análisis por RP-HPLC, tal como se esperaba, mostró claramente la ausencia del pico posterior de pGlu. Se purificó adicionalmente RSV434 del medio, se capturó en MEP HyperCell y se refinó por medio de cromatografía de intercambio aniónico.

30 Se realizó un ensayo de microneutralización de VRSh esencialmente tal como se describió en el ejemplo 6. La figura 9 muestra la neutralización de las cepas de VRS tanto Long como B-1 por tanto RSV407 como su variante de secuencia optimizada RSV434.

35 Ejemplo 19: Preparación de construcciones multivalentes de Nanobody[®] NC41 humanizado y/o de secuencia optimizada

40 Se cambiaron de formato variantes humanizadas de NC41 del ejemplo 16 como construcciones trivalentes usando conectores 15GS (en la tabla A-5 se muestran las secuencias). Se produjeron las construcciones trivalentes y se purificaron tal como se describe en el ejemplo 10. La figura 8A muestra la neutralización de las cepas de VRS tanto Long como B-1 de dos de las variantes de NC41 humanizadas trivalentes con sus Nanobodies[®] monovalentes correspondientes. La figura 8B muestra la neutralización de las cepas de VRS tanto Long como B-1 de las variantes de NC41 trivalentes. En la tabla B-7 se muestran los valores de CI₅₀ para la neutralización de las cepas de VRS Long y B-1 por las variantes de NC41 trivalentes. De manera similar a la construcción trivalente de NC41 original (RSV407), las construcciones trivalentes de las variantes de NC41 humanizadas eran neutralizadoras alrededor de 45 60 veces más potentes de Long que Synagis[®]. En la cepa B-1, las construcciones trivalentes eran neutralizadoras más potentes que Synagis, pero en este caso también estaban ligeramente potenciadas en comparación con el trivalente de NC41 original RSV407 en el siguiente orden RSV427>RSV426>RSV414. La potencia aumentada de las variantes monovalentes para B-1 parecía por tanto haber dado como resultado construcciones trivalentes ligeramente mejoradas.

50 Basándose en la optimización de secuencia adicional mostrada en los ejemplos 17 y 18, se generaron varias construcciones trivalentes adicionales (tabla B-6). Se clonaron todas las construcciones en un vector de expresión de *Pichia pastoris*, se transformaron en *Pichia* y se sometieron a fermentación para someter a prueba los niveles de expresión, la estabilidad y potencia. Tanto en expresiones en frasco de agitación a pequeña escala como 55 fermentación, RSV440 (variante 26) y RSV441 (variante 22) mostraron altos niveles de expresión.

Ejemplo 20: Eficacia *in vitro* de las construcciones multivalentes

60 Se evaluó la capacidad de neutralización del Nanobody RSV434 y Synagis en un ensayo de reducción de placas de lisis frente a 31 aislados clínicos de VRS/A y 30 de VRS/B. Ambos compuestos anti-VRS así como Synagis se sometieron a prueba a una única concentración de 40 µg/ml.

65 Synagis y RSV434 funcionaron ambos eficazmente reduciéndose respectivamente los títulos víricos del 87% y el 97% de las cepas en al menos 100 veces en comparación con el control de PBS (tabla B-8). Además, RSV434 mostró una mayor capacidad de neutralización en comparación con Synagis. La mayoría de las cepas de VRS (84%) se inhibieron completamente por RSV434 mientras que significativamente menos cepas (20%) se inhibieron

completamente por Synagis (tabla B-8).

Ejemplo 21: Eficacia *in vivo* de las construcciones multivalentes

5 El modelo de rata algodónera es el modelo de referencia para VRS. En este modelo, se infectan las ratas algodóneras con la cepa VRS/Tracy (día 0) y 4 días tras la infección, se evalúan los títulos víricos y el ARN vírico en lavados de pulmón y lavados nasales. En una configuración profiláctica, se observó una disminución significativa y dependiente de la dosis de la carga vírica tras la administración intranasal de RSV407, 24 horas antes de la infección por VRS (figura 10).

10 Además, se exploró un enfoque terapéutico en el que se trataron con los Nanobodies ratas algodóneras infectadas tras 24 h o 48 h de infección imitando de ese modo la situación de humanos infectados por VRS. En ambos casos se observó una inhibición significativa de la replicación vírica (tabla B-9 y figura 11).

15 En todos los estudios realizados hasta la fecha, se administró el Nanobody por vía intranasal como una imitación de la administración pulmonar. Usando esta vía de administración estaba disponible el 9-41% del Nanobody en los pulmones tal como se evaluó mediante ELISA en lavado bronquial tomado poco después de la administración.

20 En un intento por superar la posible interferencia de Nanobody residual en los lavados de pulmón, se retrasó la detección vírica hasta el día 7 tras la inoculación. Un estudio farmacocinético independiente realizado en ratas Sprague Dawley permitió estimar que la semivida del Nanobody en el pulmón era de aproximadamente 10,8. El día 7, que es 5-6 días tras la última administración, se aclara el Nanobody suficientemente del pulmón como para ya no interferir en el ensayo. La carga vírica de animales de control positivo descendió desde 10E5 hasta 10E2 ufp/ml. No obstante todavía era posible que se mostrase una reducción de aproximadamente 0,6 log mediante el tratamiento con RSV407 (tabla B-9).

25 Como enfoque alternativo, se desarrolló una PCR cuantitativa para detectar el ARN vírico. Tanto en experimentos profilácticos como terapéuticos, se observó una reducción significativa del ARN de VRS (tabla B-9).

30 Ejemplo 22: Generación de mutantes de escape de VRS

Con el fin de identificar los residuos de contacto críticos con la proteína F, se analizó la generación de mutantes de escape de VRS tras cultivar VRS Long en presencia de Nanobodies a aproximadamente sus concentraciones CI_{90} respectivas. Se usaron tanto NC41 monovalente (a 5 μ g/ml) como su RSV407 trivalente (a 2,5 ng/ml), así como el RSV413 trivalente biespecífico (NC41-15B3-NC41) para verificar si una construcción que reconoce dos epítopos diferentes afectaría al intervalo de tiempo de aparición de escape vírico. Tras 12 pases de incubación sucesiva de Long en células Hep2 en presencia de Nanobodies, se observó crecimiento vírico para las condiciones con NC41 monovalente pero sorprendentemente no con los Nanobodies trivalentes. Se purificaron reservas de virus individuales a partir de placas de lisis durante rondas repetitivas, tras lo cual pudo determinarse la secuencia de la proteína F de la posible variante de escape. Se identificaron dos variantes de escape distintas para NC41, NC41/13 con la mutación de N262Y, y NC41/17 que contenía la mutación N276Y.

45

TABLAS

Tabla A-1: Secuencias de Nanobodies® monovalentes que se unen a la proteína F de VRS

Nanobody®	SEQ ID NO:	Secuencia
1E4 207D1	1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTFSSYGMGWFRQAPGKERE VAAVSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNENTVYLQMNSLKPEDTAV YTCAAELTNRNPGAYYYTWAYDYWGQGTQVTVSS
7B2	2	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE VAAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS
NC23	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGRTFSSIAMGWFRQAPGKERE VAAISWSRGRTFYADSVKGRFTISRDDAANTAYLQMNSLKPEDTAVY YCAVDTASWNSGSFIYDWAYDHWGQGTQVTVSS
15H8 19C4	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRSFSNYVLGWFRQAPGKERE VAAISFRGDSAIGAPSVKGRFTISRDNKNTGYLQMNSLVPDDTAVY YCGAGTFLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS
NC41	5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGGSLSNYVLGWFRQAPGKERE VAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVY YCGAGTFLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS
NC39	6	EVQLVESGGGWVQAGGSLRLSCEASGRAFSYAMGWIRQAPGKERE VAGIDQSGESTAYGASAGRFTISRDNKNTVHLLMNSLQSDDTAVY YCVADGVLATTLNWDYWGQGTQVTVSS
15B3	7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGLTLDYYALGWFRQAPGKEREG VSCISSSDHSTTYTDSVKGRFTISWDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCAADPALGCYSGSYYPYDYWGQGTQVTVSS
191C7	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGSSGVINAMAWHRQAPGKEREL VAHISSGGSTYYGDFVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CHVPWMDYNRRDYWGQGTQVTVSS
191D3 1G3	9	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTYSTRYGMGWFRQAPGKERE VAAVSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNENTVYLQMNSLKPEDTAV YTCAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS
191E4 1B2	10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGPTFSADTMGWFRQAPGKERE VATIPWSSGAIYYSVSVKGRFTMSRDNKNTVDLQMNSLKPEDTALY YCAGSSRIYIYSDLSERSYDYWGQGTQVTVSS
192C4	11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTFSSYAMVWFRQAPGKERE FVAAVTRWSGARTVYADSVKGRFTISRDNENTVYLQMNSLKPEDTA VYTCAADSTNRNSGAVYYSWAYDYWGQGTQVTVSS
192F2	12	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTFSPIAMGWFRQAPGKERE VAVVTRWSGARTVYADSVKGRFTISRDNENTVYLQMNSLKPEDTAV YTCAADSTNRNSGAIYYTWAYDYWGQGTQVTVSS

Tabla A-2: Secuencias de proteína F

Proteína F	SEQ ID NO:	Secuencia
RSV LONG M-2	17	MELPILKANAITTILAAVTFCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKY KNAVTELQLLMQSTPAANNRARRRELPRFMNYTLNNTKKTNTVTL SKRRKRRFLGFLGVSASIASGTAVSKVLHLEGEVVKIKSALL STNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCRIS NIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELL SLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVV QLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLGNVDIF NPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IIKTFNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEF IINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNV NAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNIAFSN
RSV A-2	18	MELLIKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYTSVITIELSNIKKKCNGTDAKVKLIKQELDKY KNAVTELQLLMQSTQATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNTVTL SKRRKRRFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVVKIKSALL STNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIS NIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELL SLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVV QLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLGNVDIF NPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IIKTFNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEF IINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNV NAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNIAFSN
RSV B-1	19	MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKN AVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNYTINTTKNLNVSISKK RKRRFLGFLGVSASIASGIAVSKVLHLEGEVVKIKNALLSTNK AVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNRLLPVNVKQSCRISNIETV IEFQQMNSRLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDM PITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFF POADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIM TSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNGCD YVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFP SEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELHNVNTGKSTTNIMIT TIIIVIIIVVLLLLLIATGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAF SK

Tabla A-3: Secuencias de aminoácidos de construcciones multivalentes que se unen a VRSh

Construcción	SEQ ID NO:	Secuencia
RSV101	20	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFROAPGKEREVFAA VSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFROAPGKEREVFAAVSRLSGP RTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAAELTNRNSG AYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV102	21	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFROAPGKEREVFAA VSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFROAPGKEREV FAAVSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYT CAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV103	22	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFROAPGKEREVFAA VSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWF ROAPGKEREVFAAVSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSL KPEDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV104	23	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFROAPGKEREVFAA VSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYAW AYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFROAPGKEREVFAAVSRLSGPRTVYAD SVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYAW AYDYWGQGTQVTVSS
RSV105	24	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRITFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAA ISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQA GDSLRLSCEASGRITFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSDGSTYYADSV KGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAY DYWGQGTQVTVSS
RSV106	25	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRITFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAA ISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQAGDSLRLSCEASGRITFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSDGST YYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSY IYIWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV107	26	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREVFAA ISFRGDSAIGAPSVGRFTISRDNANTGYLQMNLSLVPDDTAVYYCGAGT PLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAG GSLRLSCEASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREVFAAISFRGDSAIGAPSV GRFTISRDNANTGYLQMNLSLVPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDY WGRGTQVTVSS
RSV108	27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREVFAA ISFRGDSAIGAPSVGRFTISRDNANTGYLQMNLSLVPDDTAVYYCGAGT PLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLRLSCEASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREVFAAISFRGDSAI GAPSVGRFTISRDNANTGYLQMNLSLVPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIY DWSYDYWGRGTQVTVSS
RSV109	28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITFSSIAMGWFRQAPGKEREVFAA ISWSRGRIFYADSVKGRFTISRDDAANTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVDTA ASWNSGSFIYDWAYDHWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ GGSLRLSCEASGRITFSSIAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSRGRIFYADSV KGRFTISRDDAANTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVDTAASWNSGSFIYDWAY DHWGQGTQVTVSS

Tabla A-3: Continuación

Construcción	SEQ ID NO:	Secuencia
RSV110	29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSSIAMGWFRQAPGKEREFVAA ISWSRGRFTFYADSVKGRFTIISRDDAANTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVD ASWNSGSFYIDWAYDHWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSSIAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSRGR FYADSVKGRFTIISRDDAANTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVDASWNSGSF IDWAYDHWGQGTQVTVSS
RSV113	30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKEREGVSC ISSSDHSTTYTDSVKGRFTISWDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADP ALGCYSGSYPRYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKEREGVSCISSSDHSTT YTDSVKGRFTISWDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADPALGCYSGSY YPRYDYWGQGTQVTVSS
RSV114	31	EVQLVESGGGWVQAGGSLRLSCAASGRAFSSYAMGWIRQAPGKEREFVAG IDQSGESTAYGASASGRFTIISRDNAKNTVHLLMNSLQSDDTAVYYCVADG VLATTLNWDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GWVQAGGSLRLSCAASGRAFSSYAMGWIRQAPGKEREFVAGIDQSGESTA YGASASGRFTIISRDNAKNTVHLLMNSLQSDDTAVYYCVADGVLATTLNWD YWGQGTQVTVSS
RSV115	32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKEREFVAT IPWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALYYCAGSS RIYIYSDLSERSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKEREFVATI PWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALYYCAGSSRIYI YSDLSERSYDYWGQGTQVTVSS
RSV116	33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGLSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAA INWRGDITIGPPNVEGRFTIISRDNKNTGYLQMNLSLAPDDTAVYYCGAGT PLNPGAYIYDWSYDYGWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLRLSCAASGGLSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITI GPPNVEGRFTIISRDNKNTGYLQMNLSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIY DWSYDYGWGRGTQVTVSS
RSV201	34	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFRQAPGKEREFVAA VSRLSGPRTVYADSVKGRFTIISRDAENTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAE LTNRNSGAYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKEREFVATI PWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALYYCAGSSRIYIYSDLSERS YDYWGQGTQVTVSS
RSV202	35	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFRQAPGKEREFVAA VSRLSGPRTVYADSVKGRFTIISRDAENTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAE LTNRNSGAYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQAGGSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKEREFVATI PWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALYYCAGSSRIYIYSD SLSERSYDYWGQGTQVTVSS
RSV203	36	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRITYSRYGMGWFRQAPGKEREFVAA VSRLSGPRTVYADSVKGRFTIISRDAENTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAE LTNRNSGAYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKEREF VATI PWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALYYCA GSSRIYIYSDLSERSYDYWGQGTQVTVSS
RSV204	37	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAA ISWSDGSTYYADSVKGRFTIISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADL TSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAISFRGDSA IGAPSVGRFTIISRDNKNTGYLQMNLSLVPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYI YDWSYDYGWGRGTQVTVSS

Tabla A-3: Continuación

Construcción	SEQ ID NO:	Secuencia
RSV205	38	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE VVAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVY YCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKERE GVSCISSSDHSTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAV YCAADPALGCYSGSYYPYDYWGQGTQVTVSS
RSV206	39	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSNYVLGWFRQAPGKERE VVAISFRGDSAI GAPSVVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLSLVPDDTAVY YCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE VVAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVY YCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV207	40	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSNYVLGWFRQAPGKERE VVAISFRGDSAI GAPSVVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLSLVPDDTAVY YCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE VVAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVY YCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV301	41	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKERE VATIPWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALY YCAGSSRIYIYSDLSERSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRYSRYGMGWFRQAPGKEREVAAVS RLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCAA ELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV302	42	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKERE VATIPWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALY YCAGSSRIYIYSDLSERSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRYSRYGMGWFRQAPGKERE VAAVSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTA VYTCAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV303	43	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFSADTMGWFRQAPGKERE VATIPWSGGIAYYSDSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNLSLKPEDTALY YCAGSSRIYIYSDLSERSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRYSRYGMW FRQAPGKEREVAAVSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV305	44	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKERE VSCISSSDHSTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVY YCAADPALGCYSGSYYPYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE VVAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVY YCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV306	45	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKERE VSCISSSDHSTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVY YCAADPALGCYSGSYYPYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSNYVLGWFRQAPGKERE VVAISFRGDSAI GAPSVVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLSLVPDDTAVY YCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS

Tabla A-3: Continuación

Construcción	SEQ ID NO:	Secuencia
RSV400	46	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREV AAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC AADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAA ISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAA DLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAIS WSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADL TSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV401	47	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREV AAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC AADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAA ISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAA DLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTDYALGWFRQAPGKEREVAAIS SSDHSTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADP ALGCYSGSYYPYDYWGQGTQVTVSS
RSV402	48	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTDYALGWFRQAPGKEREV SCISSSDHSTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC AADPALGCYSGSYYPYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAI SWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAD LTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAISW SDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADLT STNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV403	49	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREV AAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC AADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTDYALGWFRQAPGKEREVAAI ISSSDHSTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAA DPALGCYSGSYYPYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAISW SDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADLT STNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS
RSV404	50	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREV AAISFRGDSAIGAPSVVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLSLVPDDTAVYYC GAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREVAAI SFRGDSAIGAPSVVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLSLVPDDTAVYYC TPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSNYVLGWFRQAPGKEREVAAISFR GDSAIGAPSVVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLSLVPDDTAVYYC GAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS
RSV405	51	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRYSRYGMGWFRQAPGKEREV AAVSRSLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYT CAELTNRNSGAYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEV VQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRYSRYGMGWFRQAPGKEREVAA AVSRSLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYT CAELTNRNSGAYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRYSRYGMGWFRQAPGKEREVAA VSRSLSGPRTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYTCA AELTNRNSGAYYAWAYDYWGQGTQVTVSS

Tabla A-3: Continuación

Construcción	SEQ ID NO:	secuencia
RSV406	52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSIAMGWFRQAPGKEREFV AAISWSRGRFTFYADSVKGRFII SRDDAANTAYLQMNSLKPEDTAVYYC AVDTASWNSGSFIYDWAYDHWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSIAMGWFRQAPGKEREFVAA ISWSRGRFTFYADSVKGRFII SRDDAANTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAV DTASWNSGSFIYDWAYDHWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSIAMGWFRQAPGKEREFVAAIS WSRGRFTFYADSVKGRFII SRDDAANTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDT ASWNSGSFIYDWAYDHWGQGTQVTVSS
RSV407	53	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFV AAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYC GAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAI NWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAG TPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQVE SGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWR GDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPL NPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS
RSV408	54	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFV AAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYC GAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAG GSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDI TIGPPN VEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDW SYDYWGRGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSL SNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNT GYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS
RSV409	55	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFV AAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYC GAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPG AYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL SISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDI TIGPPNVEG RFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYD YWGRGTQVTVSS
RSV410	56	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFV AAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYC GAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKERE FVAAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVY YCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKE REFVAAINWRGDI TIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTA VYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS

Tabla A-3: Continuación

Construcción	SEQ ID NO:	Secuencia
RSV411	57	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAA INWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGT PLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITI GPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIY DWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKEREGVSCISSSDHSTTYTDSVKGRF TISWDNAKNTLYLQMNSLKPGDTAVYYCAADPALGCYSGSYPRYDYWGR GTQVTVSS
RSV412	58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKEREGVSC ISSSDHSTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPGDTAVYYCAADP ALGCYSGSYPRYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITI GPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIY DWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL SISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRF TISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGR GTQVTVSS
RSV413	59	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAA INWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGT PLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGLTLDYYALGWFRQAPGKEREGVSCISSSDHST YTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPGDTAVYYCAADPALGCYSGSY YPRYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL SISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRF TISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGR GTQVTVSS

Tabla A-4: Secuencias de variantes de NC41 humanizadas y/o de secuencia optimizada

Nanobody®	SEQ ID	Secuencia
NC41v01	60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLAPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v02	61	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLAPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v03	62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v04	63	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v05	64	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLAPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v06	65	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v07	66	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLAPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v08	67	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v09	68	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v10	69	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v11	70	EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v12	71	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v13	72	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v14	73	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLAPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v15	74	EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLAPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v17	75	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v18	76	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGREFVA AINWRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS
NC41v19	146	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIDWSYDYWGQGTLLTVSS

Tabla A-4: Continuación

Nanobody®	SEQ ID	secuencia
NC41v20	147	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v21	148	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v22	149	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v23	150	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLTVTVSS
NC41v24	151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLTVTVSS
NC41v25	152	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLTVTVSS
NC41v26	153	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLTVTVSS
NC41 E1D	138	DVQLVESGGGLVQAGGSLRISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLTVTVSS
NC41v03 E1D	139	DVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSLSAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAA INWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCGAGT PLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v06 E1D	140	DVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSLSAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAI NWRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCGAGTF LNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v18 E1D	141	DVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSLSAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAA INWRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCGAGT PLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v17 E1D	154	DVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSLSAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v21 E1D	155	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v22 E1D	156	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLTVTVSS
NC41v26 E1D	157	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFA AINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLTVTVSS

Tabla A-5: Secuencia de aminoácidos de construcciones humanizadas y/o de secuencia optimizada multivalentes que se unen a VRSh

Nanobody®	SEQ ID NO:	secuencia
RSV414	77	EVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAI NWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPL NPGAYIDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRGDITIGPPN VEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYD YWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAA SGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDN KNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV426	78	EVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAI NWRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPL NPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRDDITIGPPN VEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYD YWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAA SGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRDDITIGPPNVEGRFTISRDN KNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV427	79	EVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAI NWRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPL NPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRDDITIGPPN VEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYD YWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAA SGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRDDITIGPPNVEGRFTISRDN KNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV442	158	EVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAI NWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPL NPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRGDITIGPPN VEGRFTISRDNKNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYD YWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAA SGGSLSNYVLGWFRQAPGKGRFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDN KNTLYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV436	159	EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVAAI NWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLRPDDTAVYYCGAGTPL NPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVAAINWRGDITIGPPN VEGRFTISRDNKNTGYLQMNLRPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYD YWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRISCAA SGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDN KNTGYLQMNLRPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV438	160	EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVAAI NWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPL NPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVAAINWRGDITIGPPN VEGRFTISRDNKNTGYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYD YWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRISCAA SGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDN KNTGYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLVTVSS

Tabla A-5: Continuación

Nanobody®	SEQ ID NO:	secuencia
RSV439	161	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFAAINW RGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGA YIYDWSYDYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTIS RDNKNTGYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKEREVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLRPE DTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTLVTVSS
RSV434	142	DVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFAAINW RGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGA YIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL SISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTIS RDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKEREVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAPD DTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS
RSV443	143	DVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINW RGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGA YIYDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RISCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRISCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKREFVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV444	144	DVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINW RDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGA YIYDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINNRDDITIGPPNVEGRFTIS RDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKREFVFAAINNRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV445	145	DVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINW RDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGA YIYDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINNRDDITIGPPNVEGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKREFVFAAINNRDDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTVSS
RSV435	162	DVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINW RGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGA YIYDWSYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKREFVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKREFVFAAINNRGDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGQGLVTVSS

Tabla A-5: Continuación

Nanobody®	SEQ ID NO:	secuencia
RSV437	163	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVVAAINW RGDITIGPPNVEGRFTISRDNANTGYLQMNLRPDDTAVYYCGAGTPLNPGA YIIDWSYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTIS RDNANTGYLQMNLRPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLTVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKEREVVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANTGYLQMNLRP DTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLTVTVSS
RSV441	164	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVVAAINW RGDITIGPPNVEGRFTISRDNANTGYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGA YIIDWSYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTIS RDNANTGYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLTVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKEREVVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANTGYLQMNLRPE DTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGQGLTVTVSS
RSV440	165	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVVAAINW RGDITIGPPNVEGRFTISRDNANTGYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGA YIIDWSYDYWGRGTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREVVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTIS RDNANTGYLQMNLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGRGTLTVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGW FRQAPGKEREVVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANTGYLQMNLRPE DTAVYYCGAGTPLNPGAYIIDWSYDYWGRGTLTVTVSS

Tabla A-6: Combinaciones preferidas de secuencias de CDR

Nanobody®	SEQ ID	FR1	SEQ ID	CDR 1	SEQ ID	FR2	SEQ ID	CDR 2	SEQ ID	FR3	SEQ ID	CDR 3	SEQ ID	FR4	SEQ ID
NC41	5	EVQLVESGGGLVQAGG	80	NYVLG	98	WFRQAPG	99	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTGLVQ	103	GTPLNPGAYI	121	WGRGTQTVSS	122
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v01	60	EVQLLESGGGLVQP99	81	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	104	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v02	61	EVQLLESGGGLVQP99	82	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	105	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v03	62	EVQLLESGGGLVQP99	83	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	106	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v04	63	EVQLLESGGGLVQP99	84	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	107	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v05	64	EVQLLESGGGLVQP99	85	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	108	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v06	65	EVQLLESGGGLVQP99	86	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	102	RFTISRDNAKNTLYIQ	109	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLTPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v07	66	EVQLLESGGGLVQP99	87	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	110	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v08	67	EVQLLESGGGLVQP99	88	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	111	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLTPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v09	68	EVQLLESGGGLVQP99	89	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	112	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v10	69	EVQLLESGGGLVQP99	90	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	113	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v11	70	EVQLLESGGGLVQP99	91	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	114	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v12	71	EVQLLESGGGLVQP99	92	NYVLG	98	WFRQAPG	99	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	115	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPDDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v13	72	EVQLLESGGGLVQP99	93	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	116	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v14	73	EVQLLESGGGLVQP99	94	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	117	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v15	74	EVQLLESGGGLVQP99	95	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	118	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPEDTAVYYCGA		YDMSYD			
NC41v17	75	EVQLLESGGGLVQP99	96	NYVLG	98	WFRQAPG	100	AINWRGDITI	101	RFTISRDNAKNTLYIQ	119	GTPLNPGAYI	121	WQAGTLVTVSS	123
		SLRISCAASGGSLS				KREFVA		GPNVEG		MNSLAPEDTAVYYCGA		YDMSYD			

Tabla A-6: Continuación

Nanobody®	SEQ ID	FR1	SEQ ID	CDR 1	SEQ ID	FR2	SEQ ID	CDR 2	SEQ ID	FR3	SEQ ID	CDR 3	SEQ ID	FR4	SEQ ID
NC41v18	76	evqlleagggglvqpgg slrlscaasggsls	97	NYVLG	98	wfrqapg krefva	100	AINRRDDITI GPPNVEG	102	lftfstrdmskntlylq mnsllpedtavyycga	120	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	wgggtlvtvss	123
NC41v19	146	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	103	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGQGTLLVTSS	123
NC41v20	147	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	167	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGQGTLLVTSS	123
NC41v21	148	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	116	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGQGTLLVTSS	123
NC41v22	149	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	168	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGQGTLLVTSS	123
NC41v23	150	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	103	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGRGTLVTSS	169
NC41v24	151	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	167	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGRGTLVTSS	169
NC41v25	152	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	116	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGRGTLVTSS	169
NC41v26	153	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGSLs	166	NYVLG	98	WFRQAPG KREFVA	99	AINRRGDITI GPPNVEG	101	RFTISRDNARNTGYLQ MNSLAPDDTAVYYCGA	168	GTPLNFGAYI YDMSYDY	121	WGRGTLVTSS	169

Tabla A-7: Secuencias de conector

Conector	SEQ ID NO:	Secuencias
5GS	124	GGGGS
7GS	125	SGGSGGS
9GS	126	GGGGSGGGS
10GS	127	GGGGSGGGGS
15GS	128	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS	129	GGGGSGGGGSGGGGS
20GS	130	GGGGSGGGGSGGGGS
25GS	131	GGGGSGGGGSGGGGS
30GS	132	GGGGSGGGGSGGGGS
35GS	133	GGGGSGGGGSGGGGS
Bisagra de G1	134	EPKSCDKTHTCPPCP
Bisagra de 9GS-G1	135	GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
Bisagra de G3	136	ELKTPFGDTTHTCFRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCP
3Ala	137	AAA

Tabla B-1: Características de Nanobodies® que se unen a proteína F de VRSh

Clon	Familia	Epítipo	Unión a VRSh	Competencia con Fab de Synagis®	Análisis cinético			Neutralización de VRS CI50 (nM)(n=2)		
			EC50	EC50	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD	Long	A-2	B1
191D3	LG 3sub2	II	1,5E-10	5,9E-09	1,5E+06	2,8E-03	1,9E-09	253	227	-
1E4	LG 3sub2	II	6,6E-11	4,5E-09	8,0E+05	1,3E-03	1,6E-09	380	298	ND
7B2	16	II	9,0E-11	1,9E-09	5,7E+05	6,5E-04	1,1E-09	91	177	2680
NC23	34	II	1,0E-10	2,3E-09	8,0E+05	7,4E-04	9,2E-10	144	109	-
15H8	29	II	8,3E-10	3,9E-08	1,2E+06	2,1E-02	1,6E-08	200	218	2340
NC41	29	II	4,1E-10	3,2E-08	8,2E+05	6,7E-03	8,1E-09	58	26	4000
15B3	4sub1	IV-VI	5,8E-11	-	4,1E+05	2,7E-04	6,7E-10	-	-	1274
191E4	LG 21	IV-VI	8,3E-11	-	5,7E+05	1,5E-04	2,7E-10	-	-	4327
Synagis®		II			2,8E+05	1,8E-04	6,4E-10	4	2,5	1,7

Tabla B-2: Nomenclatura para construcciones de Nanobody® multivalentes dirigidas contra la proteína F de VRSh

Tipo	Nombre	Construcción	SEQ ID NO	
Bivalente	RSV101	191D3-15GS-191D3	20	
	RSV102	191D3-25GS-191D3	21	
	RSV103	191D3-35GS-191D3	22	
	RSV104	191D3-9GS-191D3	23	
	RSV105	7B2-9GS-7B2	24	
	RSV106	7B2-15GS-7B2	25	
	RSV107	15H8-9GS-15H8	26	
	RSV108	15H8-15GS-15H8	27	
	RSV109	NC23-9GS-NC23	28	
	RSV110	NC23-15GS-NC23	29	
	RSV113	15B3-15GS-15B3	30	
	RSV114	NC39-20GS-NC39	31	
	RSV115	191E4-18GS-191E4	32	
	RSV116	NC41-15GS-NC41	33	
	Biparátopo	RSV201	191D3-9GS-191E4	34
		RSV202	191D3-15GS-191E4	35
RSV203		191D3-25GS-191E4	36	
RSV204		7B2-15GS-15H8	37	
RSV205		7B2-15GS-15B3	38	
RSV206		15H8-15GS-15B3	39	
RSV207		15H8-15GS-7B2	40	
RSV301		191E4-9GS-191D3	41	
RSV302		191E4-15GS-191D3	42	
RSV303		191E4-25GS-191D3	43	
RSV305		15B3-15GS-7B2	44	
RSV306		15B3-15GS-15H8	45	
Trivalente		RSV400	7B2-15GS-7B2-15GS-7B2	46
	RSV401	7B2-15GS-7B2-15GS-15B3	47	
	RSV402	15B3-15GS-7B2-15GS-7B2	48	
	RSV403	7B2-15GS-15B3-15GS-7B2	49	
	RSV404	15H8-15GS-15H8-15GS-15H8	50	
	RSV405	191D3-15GS-191D3-15GS-191D3	51	
	RSV406	NC23-15GS-NC23-15GS-NC23	52	
	RSV407	NC41-15GS-NC41-15GS-NC41	53	
	RSV408	NC41-AAA-NC41-AAA-NC41	54	
	RSV409	NC41-9GS-NC41-9GS-NC41	55	
	RSV410	NC41-20GS-NC41-20GS-NC41	56	
	RSV411	NC41-15GS-NC41-15GS-15B3	57	
	RSV412	15B3-15GS-NC41-15GS-NC41	58	
	RSV413	NC41-15GS-15B3-15GS-NC41	59	

Tabla B-3: Reactividad de Nanobodies® monovalentes con extractos de antígeno de células HEp-2 infectadas con diferentes mutantes de escape de la cepa Long

Nanobody®	Virus									
	R47F/4	R47F/7	RAK13/4	R7C2/11	R7C2/1	R7.936/1	R7.936/4	R7.936/6	R9.432/1	RRA3
192C4										
191D3		▨								
191E4	■					▨	▨	▨		
192F2										
191C7	■									
15B3								▨		
NC23				▨						
15H8										
7B2		▨								
NC41										
Sustitución de aa	N262Y	N268I	N216D / N262Y	K272T	K272E	V447A	K433T	K432T	S436F	N262Y / R429S

Tabla B-4: Reactividad de Nanobodies® monovalentes y bivalentes con extractos de antígeno de células HEp-2 infectadas con diferentes mutantes de escape de la cepa Long

Nanobody®	Virus		
	R7C2/11	R7C2/1	R7.936/4
7B2			
RSV106: 7B2-7B2	Diagonal lines		
RSV400: 7B2-7B2-7B2	Black		
RSV403: 7B2-15B3-7B2	Black		
15B3			
RSV113: 15B3-15B3			Diagonal lines
191D3			
RSV101: 191D3-191D3			
15H8			
RSV108: 15H8-15H8	Diagonal lines		
NC23	Grid pattern		
RSV110: NC23-NC23	Grid pattern		
191E4			
Sustitución de aa	K272T	K272E	K433T

Tabla B-5: Neutralización y parámetros de unión cinéticos en Biacore sobre proteína F_{im}-NN para variantes de NC41 seleccionadas

Nombre	CI50 de neutralización (nM)				Biacore (F _{im} -NN)			
	Long	B-1	Long	B-1	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
NC41	202	4707	122	3291	1,7E+06	6,70E-03	4,00E-09	
NC41v03	255	1507	nd	nd	nd	nd	nd	
NC41v06	111	806	nd	nd	2,0E+06	4,80E-03	2,50E-09	
NC41v17	249	677	149	346	1,9E+06	5,90e-03	3,20E-09	
NC41v18	116	728	98	194	nd	nd	nd	
Synagis	7,3	2,1	6,0	2,9				

Tabla B-6: Variantes humanizadas y/o de secuencia humanizada trivalentes de NC41

Nombre	Construcción	SEQ ID NO
RSV414	NC41v03-15GS-NC41v03-15GS-NC41v03	77
RSV426	NC41v06-15GS-NC41v06-15GS-NC41v06	78
RSV427	NC41v18-15GS-NC41v18-15GS-NC41v18	79
RSV434	NC41 ^{E1D} -15GS-NC41-15GS-NC41	142
RSV435	NC41v17 ^{E1D} -15GS-NC41v17-15GS-NC41v17	162
RSV436	NC41v20-15GS-NC41v20-15GS-NC41v20	159
RSV437	NC41v20 ^{E1D} -15GS-NC41v20-15GS-NC41v20	163
RSV438	NC41v22-15GS-NC41v22-15GS-NC41v22	160
RSV439	NC41v26-15GS-NC41v26-15GS-NC41v26	161
RSV440	NC41v26 ^{E1D} -15GS-NC41v26-15GS-NC41v26	165
RSV441	NC41v22 ^{E1D} -15GS-NC41v22-15GS-NC41v22	164
RSV442	NC41v17-15GS-NC41v17-15GS-NC41v17	158
RSV443	NC41v03 ^{E1D} -15GS-NC41v03-15GS-NC41v03	143
RSV444	NC41v06 ^{E1D} -15GS-NC41v06-15GS-NC41v06	144
RSV445	NC41v18 ^{E1D} -15GS-NC41v18-15GS-NC41v18	145

Tabla B-7: Neutralización de Long y B-1 por variantes de NC41 trivalentes

ID	Trivalente	Long		B-1	
		CI50 [M]	Razón con Synagis	CI50 [M]	Razón con Synagis
Serie experimental 1					
RSV407	NC41	9,41E-11	59	6,6E-10	3
RSV414	NC41v03	7,81E-11	72	1,61E-10	11
RSV426	NC41v06	8,98E-11	63	9,32E-11	20
RSV427	NC41v18	9,13E-11	62	4,61E-11	40
Serie experimental 2					
RSV407	NC41	13,06E-11	111	51E-11	11
RSV434	NC41 (E1D)	15E-11	107	56E-11	9
RSV441	NC41v22 (E1D)	7,94E-11	209		

5 Tabla B-8: Capacidad de neutralización de RSV434 y Synagis en ensayo de placas de lisis contra diversos aislados clínicos

Grupo de VRS	Número con reducción de 100 veces o mayor (%)		Comparación entre fármacos en estudio	Número con inhibición completa del virus (%)		Comparación entre fármacos en estudio
	Synagis	RSV434	Valor de P	Synagis	RSV434	Valor de P
RSV/A	27/31 (87,1%)	31/31 (100%)	0,11	1/31 (3,2%)	29/31 (93,5%)	<0,0001
RSV/B	26/30 (86,7%)	28/30 (93,3%)	0,67	11/30 (36,7%)	22/30 (73,3%)	0,009
Total	53/61 (86,9%)	59/61 (96,7%)	0,09	12/61 (19,7)	51/61 (83,6%)	<0,0001

Tabla B-9: Tabla de resumen de todos los experimentos con ratas de algodón realizados que muestra tanto la detección de virus de replicación competente como ARN vírico en el día 4 tras la inoculación (en el experimento 3 también se realizó detección en el día 7)

	Dosis de Nanobody	Régimen de tratamiento	Diferencia de carga vírica frente al control (log ₁₀ ufp)	Reducción en veces de ARN vírico (2 ^{ΔCT})
Exp. 1	RSV407 5 mg/kg	Día profiláctico -1 Día terapéutico +1, 2, +3 Día terapéutico +2, +3	-2,59* -2,88* -2,83*	286,7* 4,4* 4,6*
Exp. 2	RSV407 5 mg/kg 1 mg/kg 0,2 mg/kg 0,04 mg/kg	Día profiláctico -1	-3,01* -2,37* -1,43* -0,37	79,2* 61,3* 28,1* 11,7*
Exp. 3	RSV407 5 mg/kg	Día terapéutico +1 (lectura el día 7) día terapéutico +1, +2 (lectura el día 7)	-2,04* (0,63*) -2,47* (0,57)	2,9* (1,8) 2,5* (4,5*)
Exp. 4	RVS407 0,2 mg/kg RSV503 1 mg/kg 0,2 mg/kg 0,04 mg/kg	Día profiláctico -1	-0,75* -1,27* -0,71* -0,22*	29,8* 31,4* 30,4* 15,5*
Exp. 5	RSV434 20 mg/kg 4 mg/kg 2 mg/kg 1 mg/kg	Día terapéutico +2, +3	-2,89* -1,76* -1,81* -1,66*	10,2* 1,9 5,5* 3,9*
Exp. 6	RSV434 5 mg/ml 20 mg/ml 80 mg/ml	Día terapéutico +2, +3	-3,15* -2,64* -3,30*	10* 2,4* 4,3*

* p < 0,05

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido trivalente que está dirigido contra la proteína F de VRSh, que se elige de uno cualquiera de (A) a (C):

5 (A) polipéptido trivalente elegido de los siguientes polipéptidos:

a) SEQ ID NO: 142-145 y 162-165;

10 b) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 142-145 y 162-165, siempre que:

i) la primera secuencia de aminoácidos abarcada en dicho polipéptido tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1; y

15 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o el polipéptido tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

20 c) SEQ ID NO: 77-79 y 158;

d) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 77-79 y 158, siempre que:

25 i) las secuencias de aminoácidos abarcadas en dicho polipéptido tengan una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, una leucina (Leu, L) en la posición 78, una arginina (Arg, R) en la posición 83 y/o un ácido glutámico (Glu, E) en la posición 85, en el que dichas posiciones se determinan según la numeración de Kabat; y

30 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o el polipéptido tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

35 e) SEQ ID NO: 159-161;

f) polipéptidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 159-161, siempre que:

40 i) la secuencia de aminoácidos abarcada en dicho polipéptido tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108, en el que dichas posiciones se determinan según la numeración de Kabat; y

45 ii) el polipéptido se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o el polipéptido tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con el polipéptido sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;

50 (B) polipéptido trivalente que comprende o que consiste en tres secuencias de aminoácidos que consisten en 4 regiones de armazón y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR) en las que:

- CDR1 es SEQ ID NO: 98;

y

55 - CDR2 es SEQ ID NO: 102;

y

60 - CDR3 es SEQ ID NO: 121,

(C) polipéptido trivalente que comprende o que consiste en tres secuencias de aminoácidos, en el que cada secuencia de aminoácidos se elige de las siguientes a) a d):

65 a) SEQ ID NO: 60-76;

b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:

5 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, en el que dicha posición se determina según la numeración de Kabat; y

10 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,

c) SEQ ID NO: 146-153;

15 d) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:

20 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108, en el que dichas posiciones se determinan según la numeración de Kabat; y

25 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido.

2. Polipéptido trivalente según la reivindicación 1, que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 53,

30 - en el que el primer ácido glutámico se ha cambiado a ácido aspártico, y en el que opcionalmente en al menos una secuencia de VHH que forma parte de SEQ ID NO: 53, uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp; o

35 - en el que en al menos una secuencia de VHH que forma parte de SEQ ID NO: 53, uno o más residuos de aminoácido se han mutado seleccionados de los siguientes: Val5Leu, Ala14Pro, Ser19R, Ile20Leu, Glu44Gly, Ala74Ser, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp.

40 3. Polipéptido trivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 53, en el que en al menos una secuencia de VHH que forma parte de SEQ ID NO: 53, el/los siguiente(s) residuo(s) de aminoácido se ha(n) mutado:

- Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

45 - Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;

50 - Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;

- Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;

55 - Gly54Asp;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;

60 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;

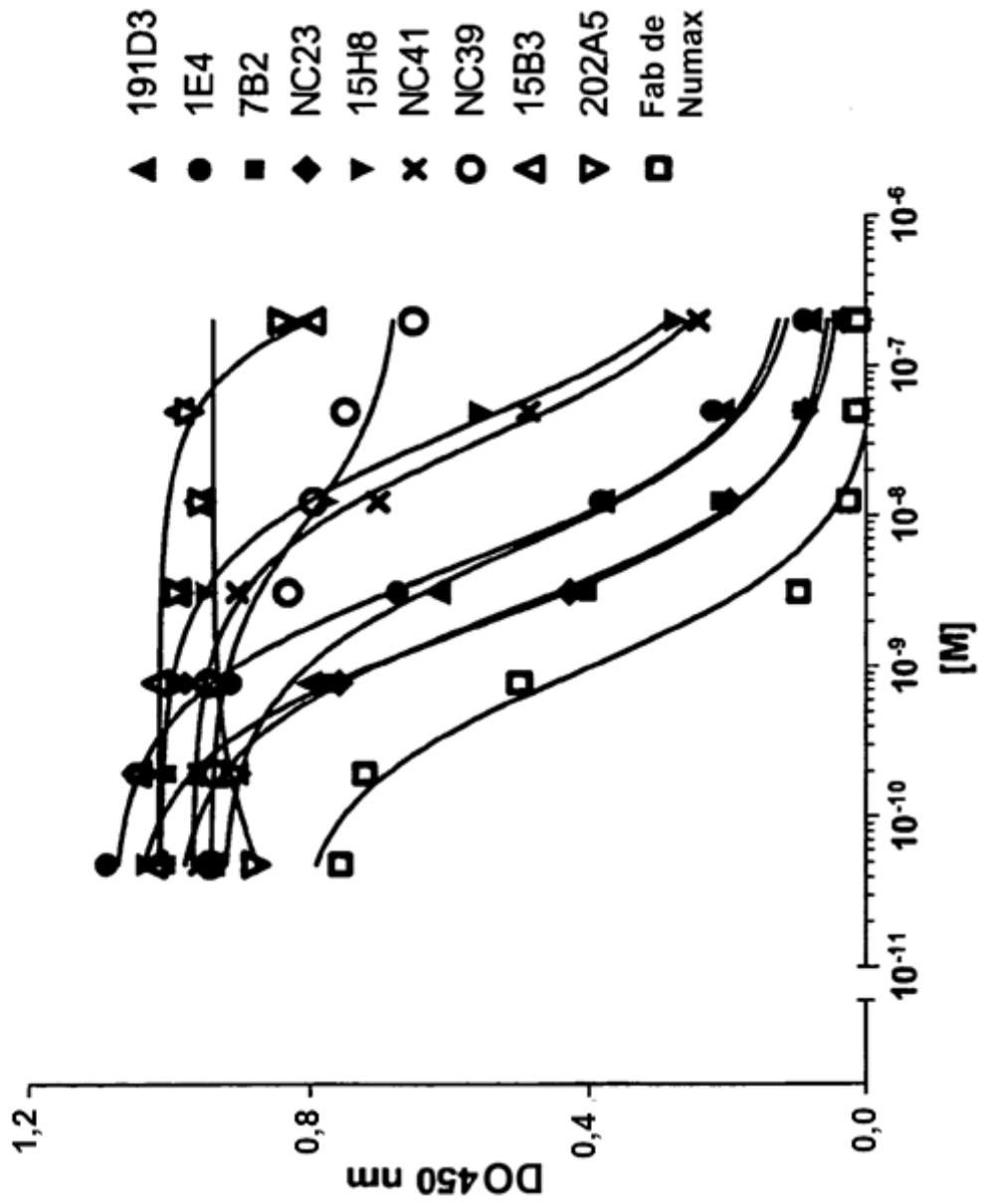
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;

65 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;

- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 5 - Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- Glu1Asp;
- Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- 10 - Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gln108Leu;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln;
- 15 - Glu1Asp, Val5Leu, Ala14Pro, Glu44Gly, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln, Gln108Leu y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Gly78Leu, Ala83Arg, Asp85Glu, Arg105Gln y Gly54Asp;
- 20 - Glu1Asp y Gly54Asp;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu y Gln108Leu;
- 25 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Ala83Arg;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu y Arg105Gln;
- 30 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Asp85Glu;
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg y Arg105Gln;
- 35 - Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Asp85Glu y Arg105Gln; o
- Glu1Asp, Ala14Pro, Ser19Arg, Ile20Leu, Gln108Leu, Ala83Arg, Asp85Glu y Arg105Gln.
- 40 4. Polipéptido trivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende o que consiste en una de SEQ ID NO: 77-79, 142-145 y 158-165.
- 5. Método para preparar un polipéptido trivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho método al menos las etapas de unir tres secuencias de aminoácidos monovalentes o construcciones monovalentes seleccionadas de:
- 45 a) SEQ ID NO: 60-76;
- b) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 60-76, siempre que:
- 50 i) la secuencia de aminoácidos tenga una glutamina (Gln, Q) en la posición 105, en el que dicha posición se determina según la numeración de Kabat; y
- ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido;
- 55 c) SEQ ID NO:146-153;
- 60 d) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 146-153, siempre que:
- 65 i) la secuencia de aminoácidos tenga una prolina (Pro, P) en la posición 14, arginina (Arg, R) en la posición 19, leucina (Leu, L) en la posición 20 y leucina (Leu, L) en la posición 108, en el que dichas posiciones se determinan según la numeración de Kabat; y

- 5 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,
- e) SEQ ID NO: 138-141 y 154-157;
- 10 f) secuencias de aminoácidos que tienen una diferencia de no más de 3, preferiblemente no más de 2, más preferiblemente no más de 1 aminoácido con una de SEQ ID NO: 138-141 y 154-157, siempre que:
- i) la secuencia de aminoácidos tenga un ácido aspártico (Asp, D) en la posición 1, en el que dicha posición se determina según la numeración de Kabat; y
- 15 ii) la secuencia de aminoácidos se una a la proteína F de VRSh con una afinidad igual o superior, en el que dicha afinidad se mide mediante resonancia de plasmón superficial y/o la secuencia de aminoácidos tenga una potencia igual o superior, en el que dicha potencia se determina mediante ensayo de microneutralización, en comparación con la secuencia de aminoácidos sin la diferencia de 3, 2 o 1 aminoácido,
- 20 y por ejemplo uno o más conectores.
6. Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos, que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 7. Huésped o célula huésped que expresa un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y/o que comprende un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6.
8. Composición que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6.
- 30 9. Composición según la reivindicación 8, que es una composición farmacéutica.
10. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un portador adecuado para administración pulmonar.
- 35 11. Método para producir un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:
- 40 a) expresar, en una célula huésped o un organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6, o cultivar y/o mantener un huésped o una célula huésped según la reivindicación 7 en condiciones que son tales que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, opcionalmente seguido por:
- 45 b) aislar y/o purificar el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 así obtenido.
12. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de al menos una de enfermedad respiratoria, infección respiratoria de vías altas, infección respiratoria de vías bajas, bronquiolitis, neumonía, disnea, tos, sibilancias y asma.
- 50 13. Dispositivo farmacéutico adecuado para la administración pulmonar que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 55 14. Dispositivo farmacéutico según la reivindicación 13, que es un inhalador para líquidos, un aerosol o un inhalador de polvo seco, que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Figura 1



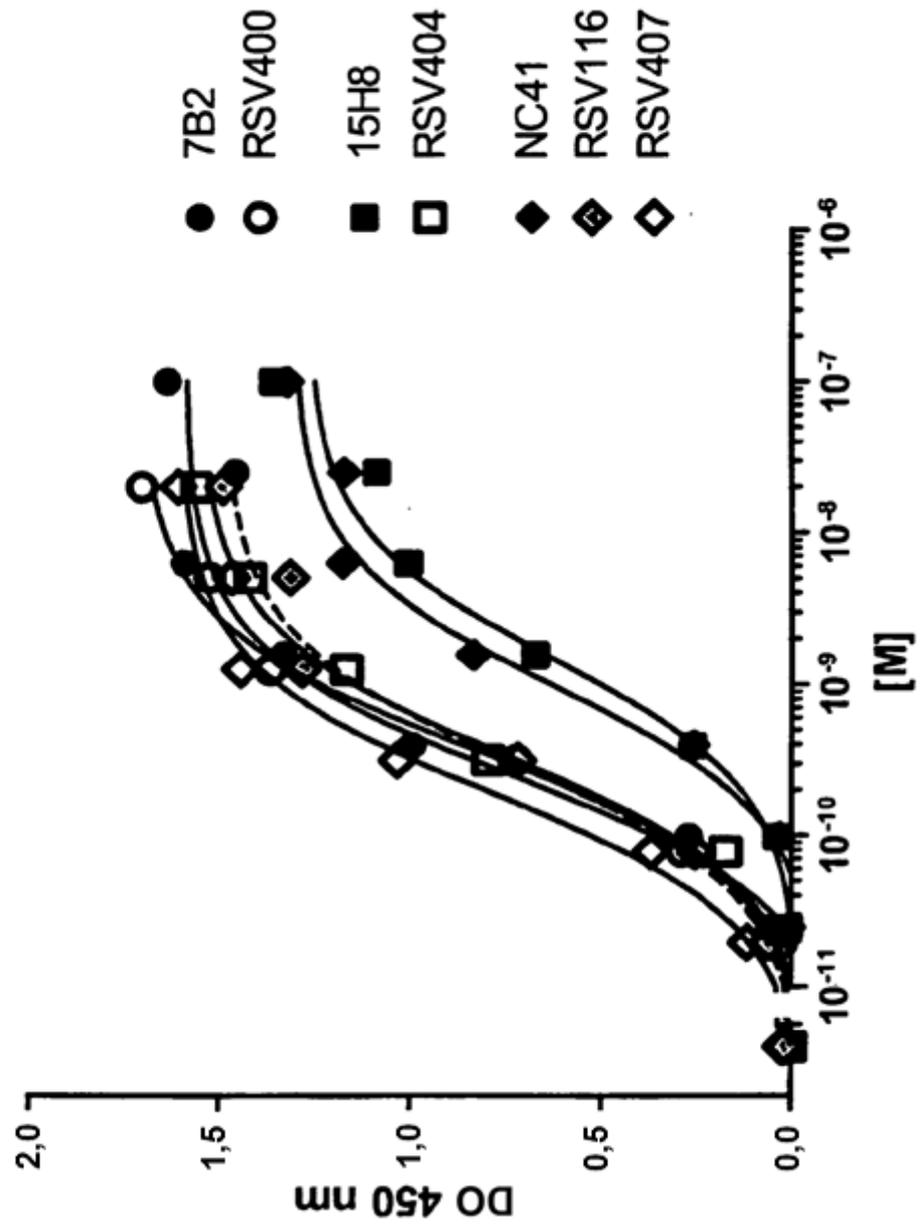


Figura 2

Figura 3A

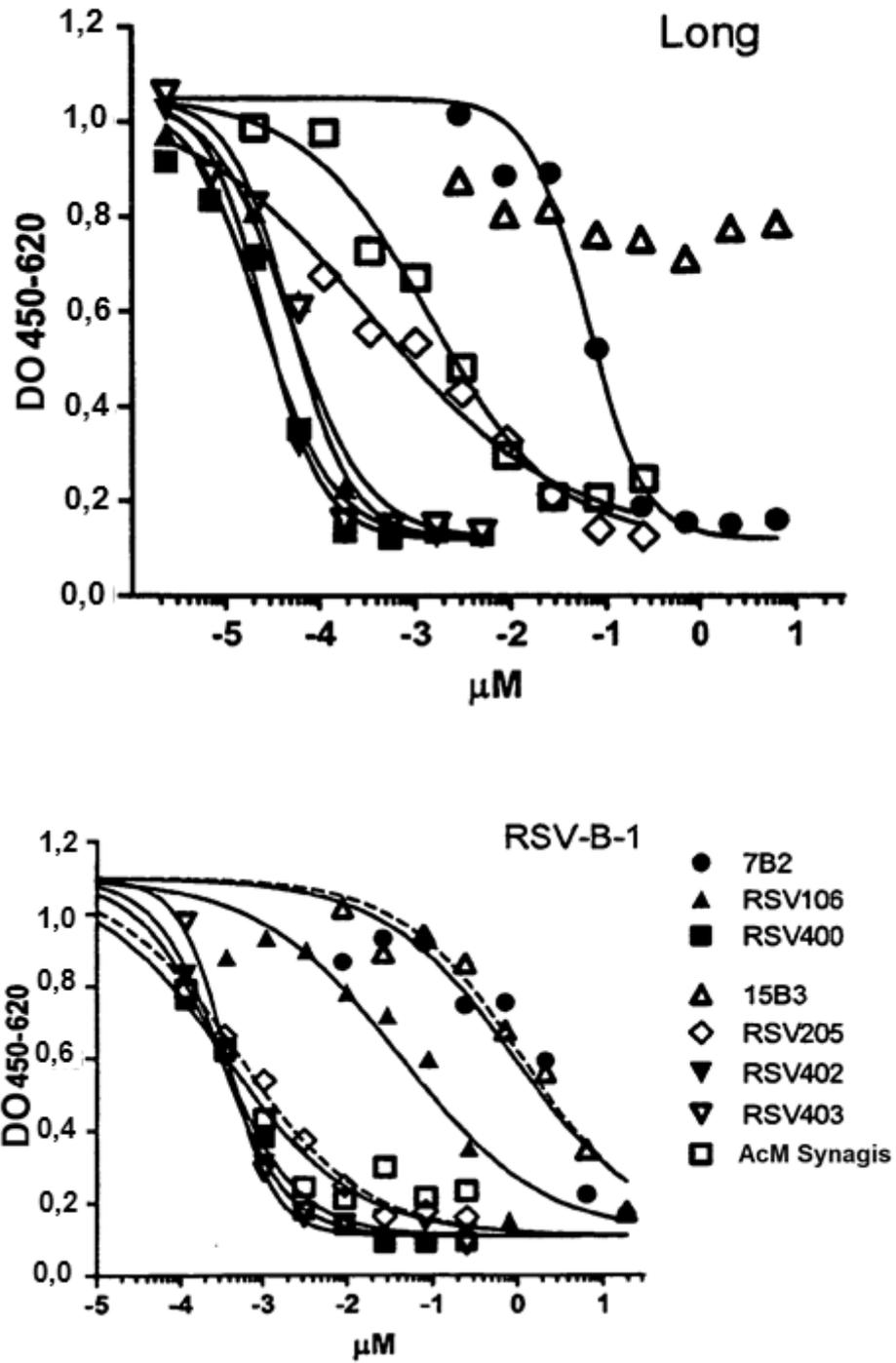


Figura 3B

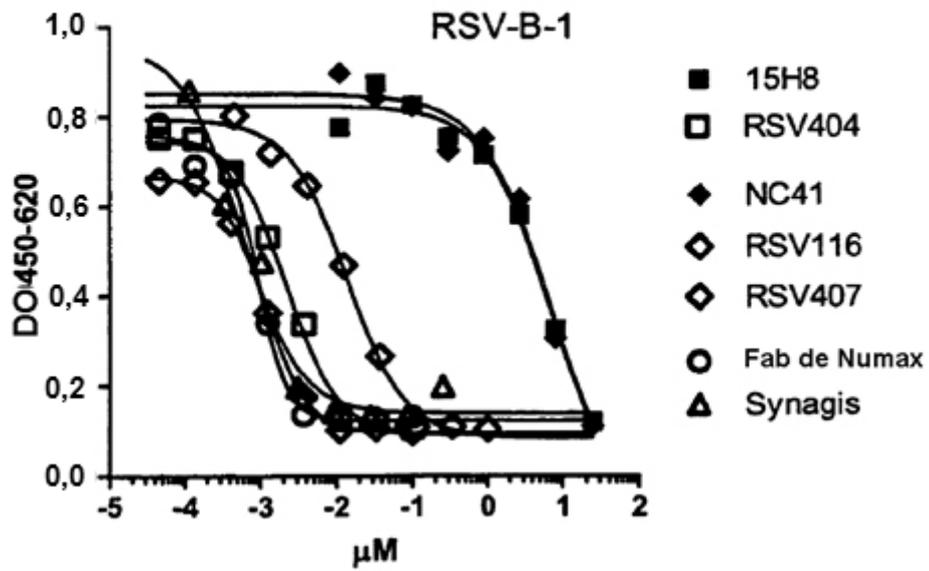
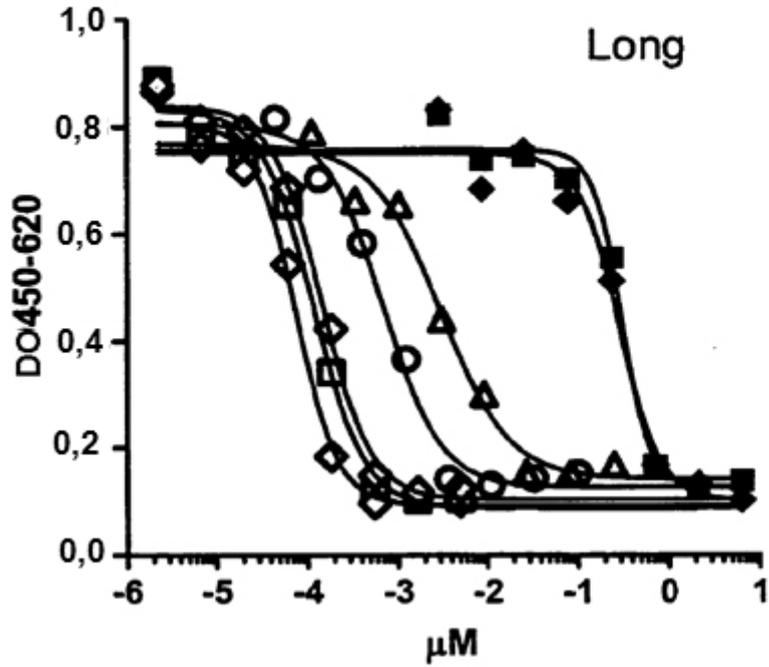
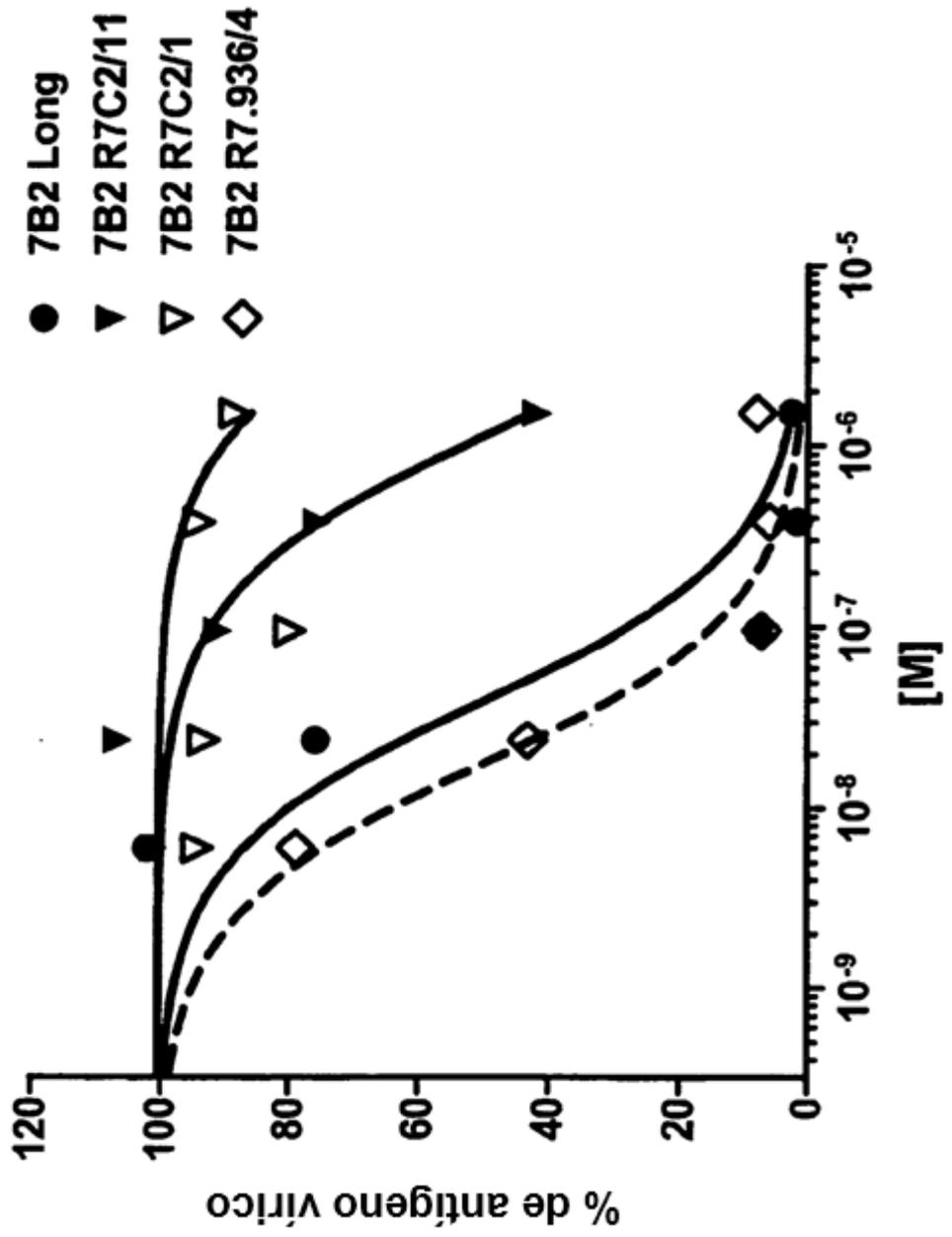


Figura 4A



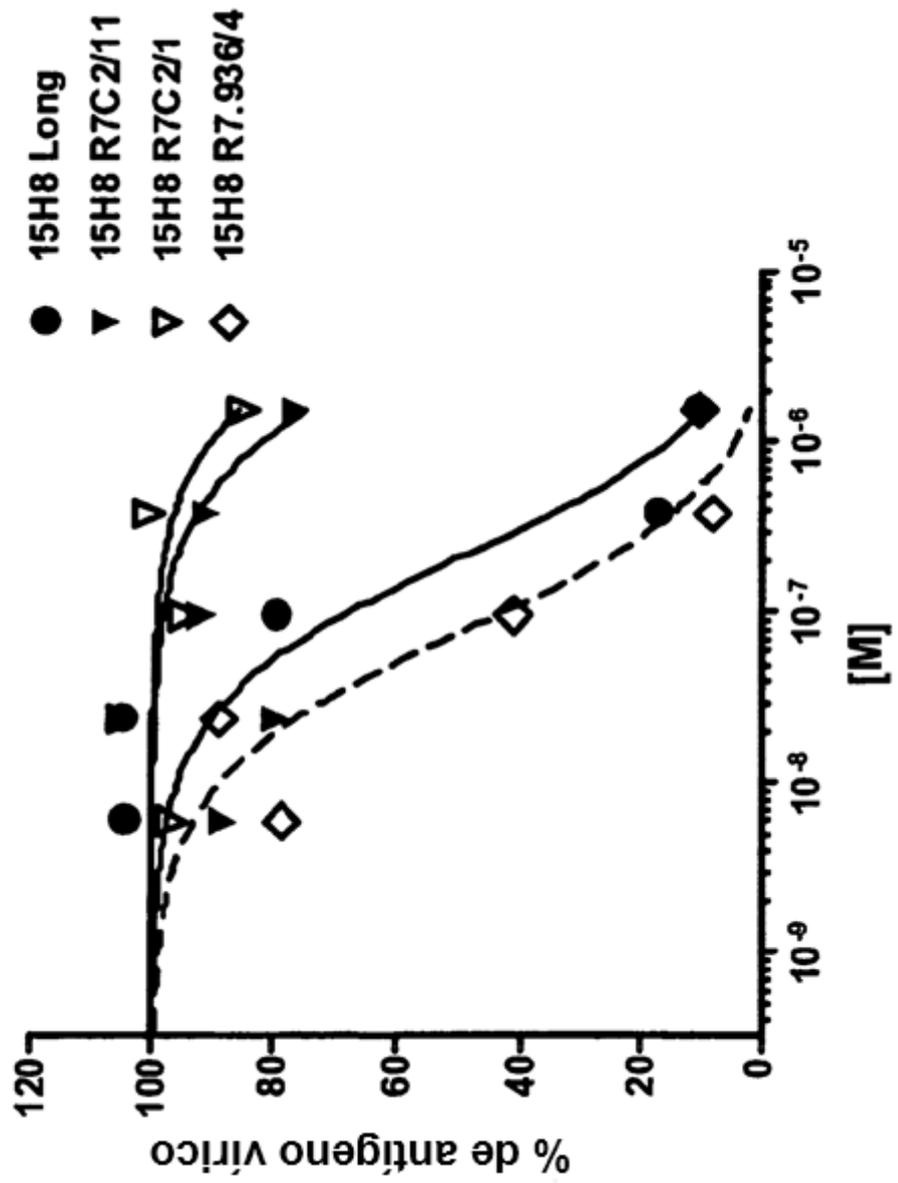


Figura 4B

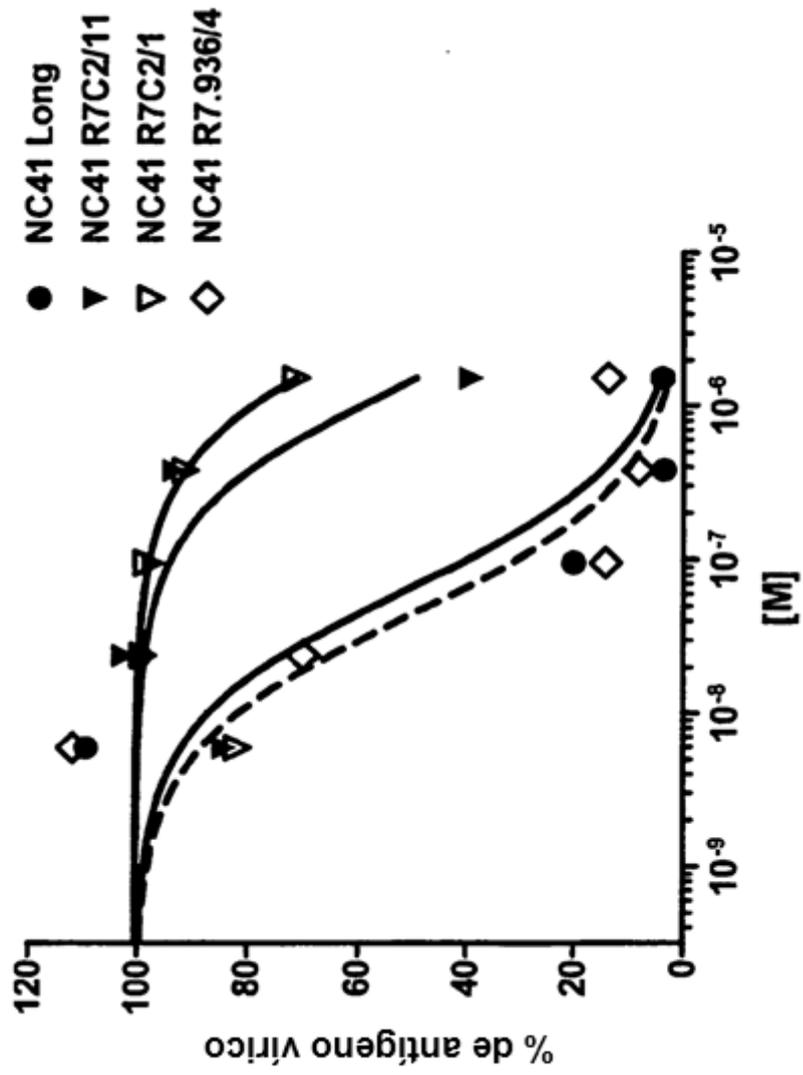


Figura 4C

Figura 4D

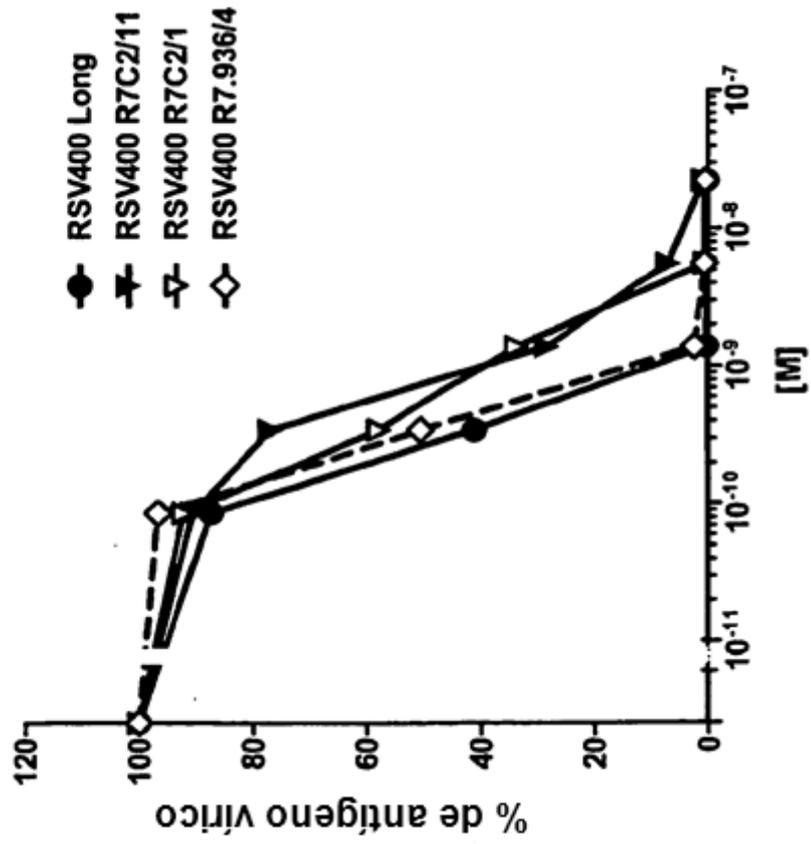


Figura 4E

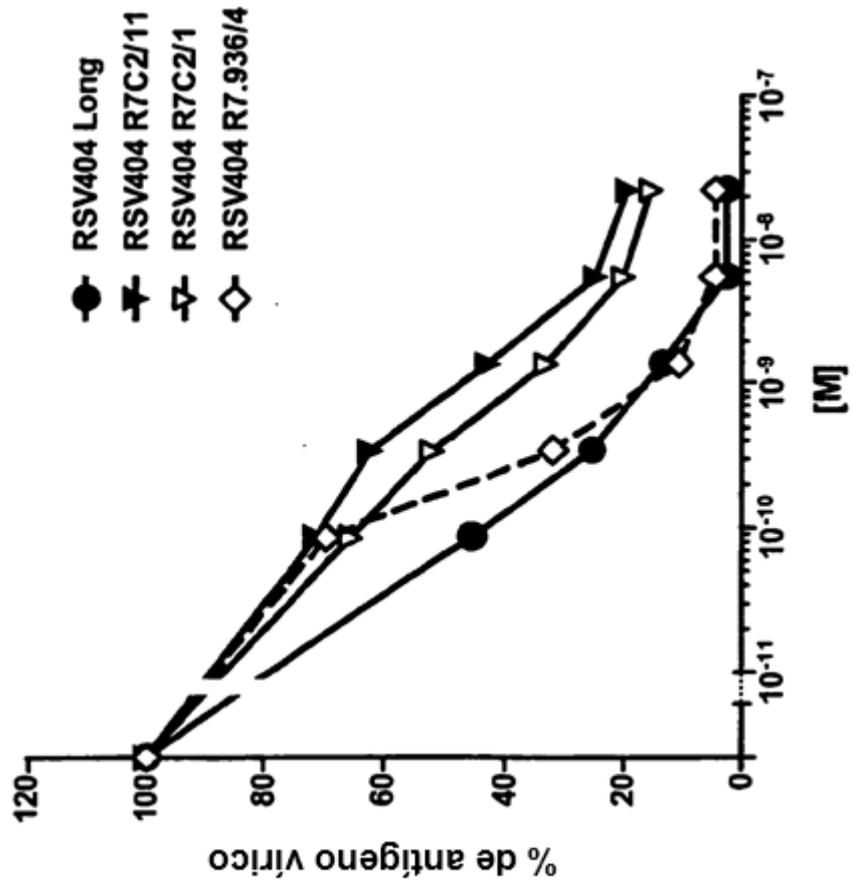


Figura 4F

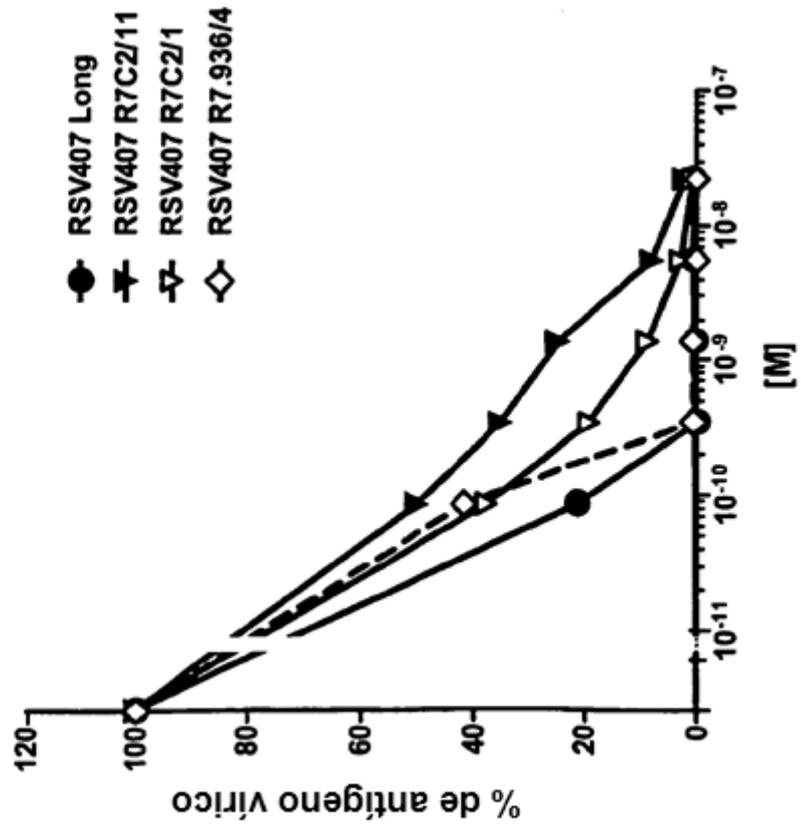


Figura 4G

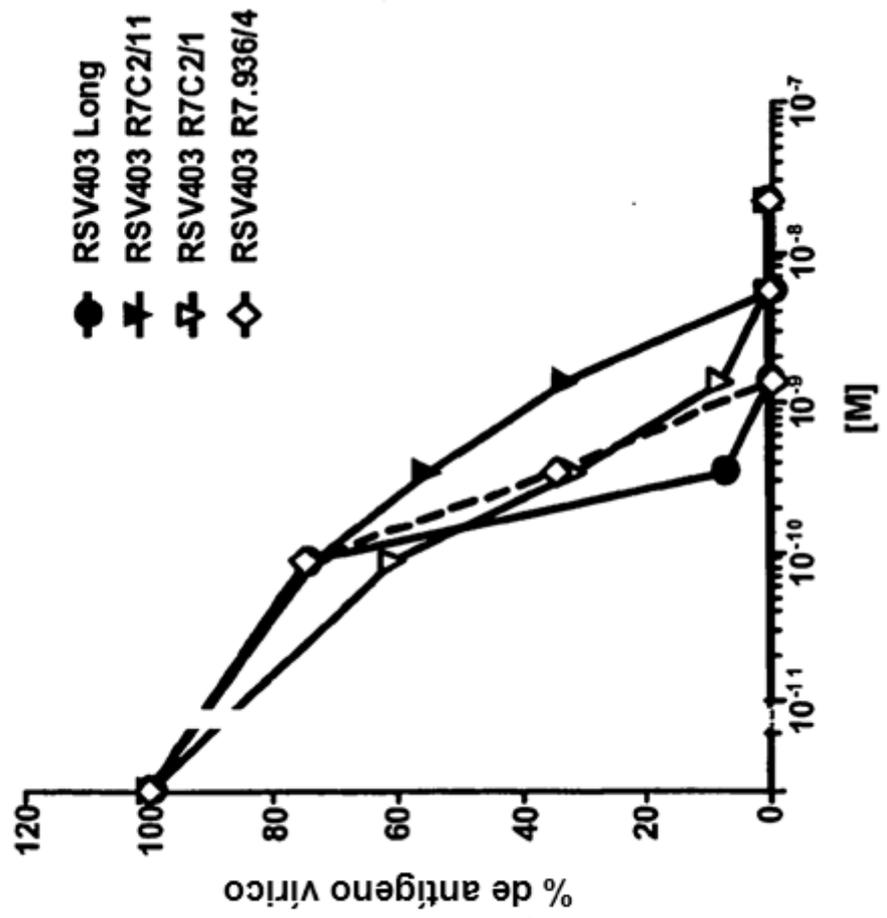


Figura 5

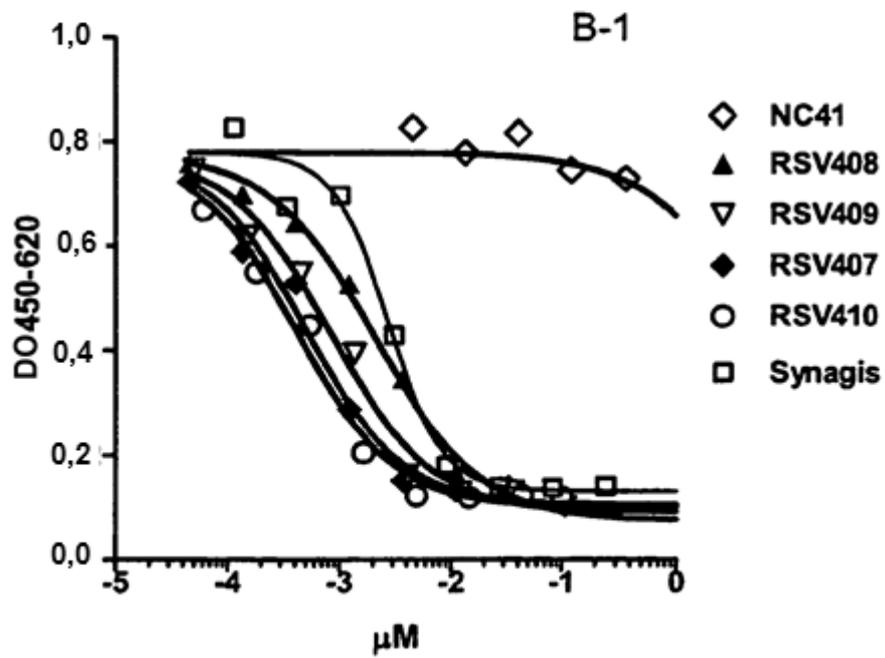
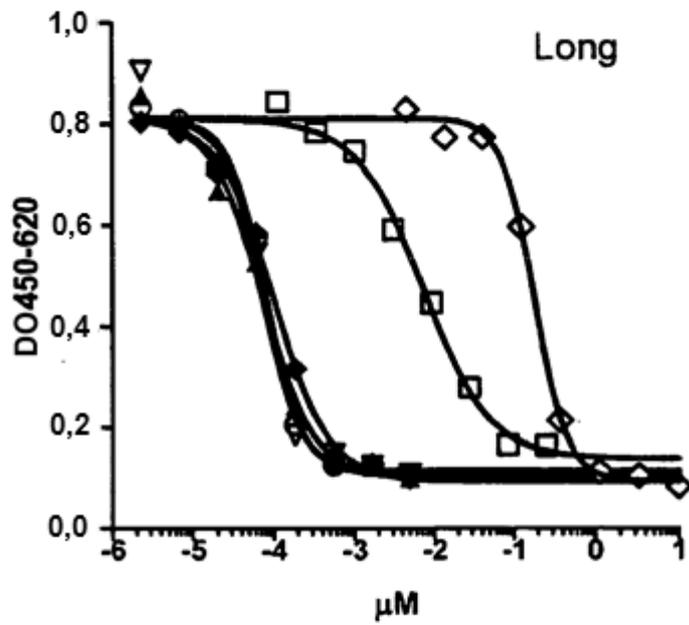


Figura 6

	V5L	A14P	S19R	I20L	E44G	G54D	A74S	G78L	A83R	D85E	R105Q	Q108L	Nº de mutaciones
NC41v01	I	P	R	.	G	.	.	I	.	E	Q	I	9
NC41v02	I	P	R	.	G	.	S	I	.	E	Q	I	9
NC41v03	I	P	R	.	G	.	S	I	R	E	Q	I	10
NC41v04	I	P	.	.	G	.	S	I	R	.	Q	I	8
NC41v05	I	P	.	.	G	.	S	I	.	E	Q	I	8
NC41v06	I	P	R	L	G	D	.	I	R	E	Q	I	11
NC41v07	I	P	.	.	G	.	.	I	.	.	Q	I	6
NC41v08	I	P	.	.	G	.	.	.	R	E	Q	I	7
NC41v09	I	P	.	.	G	.	S	.	R	.	Q	I	7
NC41v10	I	P	.	.	G	Q	I	5
NC41v11	I	.	.	.	G	Q	I	4
NC41v12	I	P	Q	I	4
NC41v13	I	P	R	L	G	E	Q	I	8
NC41v14	I	P	R	L	G	.	S	I	.	E	Q	I	10
NC41v15	I	.	R	L	G	.	.	I	.	E	Q	I	8
NC41v16	I	P	R	L	.	.	.	I	.	E	Q	I	8
NC41v17	I	P	R	L	G	.	S	I	R	E	Q	I	11
NC41v18	I	P	R	L	G	D	S	I	R	E	Q	I	12

Figura 7

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
NC41	evqlvesggglvqaggsllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v01	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v02	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v03	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v04	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v05	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v06	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRDDITIGPPNVEG
NC41v07	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v08	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v09	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v10	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v11	evqllesggglvqaggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v12	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v13	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v14	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v15	evqllesggglvqaggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v17	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRGDITIGPPNVEG
NC41v18	evqllesggglvqpggsllrllscaasggslls	NYVLG	wfrqapgkerefva	AINWRDDITIGPPNVEG

Figura 7: continuación

	FR3	CDR3	FR4
NC41	rftisrdnakntgylqmnslapddtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgrgtqvtvss
NC41v01	rftisrdnakntlylqmnslapedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v02	rftisrdnskntlylqmnslapedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v03	rftisrdnskntlylqmnsrpedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v04	rftisrdnskntlylqmnsrpdddtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v05	rftisrdnskntlylqmnslapedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v06	rftisrdnakntlylqmnsrpedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v07	rftisrdnakntlylqmnslapddtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v08	rftisrdnakntlylqmnsrpedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v09	rftisrdnskntlylqmnsrpdddtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v10	rftisrdnakntgylqmnslapddtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v11	rftisrdnakntgylqmnslapddtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v12	rftisrdnakntgylqmnslapddtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v13	rftisrdnakntgylqmnslapedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v14	rftisrdnskntlylqmnslapedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v15	rftisrdnakntlylqmnslapedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v17	rftisrdnskntlylqmnsrpedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss
NC41v18	rftisrdnskntlylqmnsrpedtavyycca	GTPLNPGAYIYDWSYDY	wgqgtlvtvss

Figura 8A

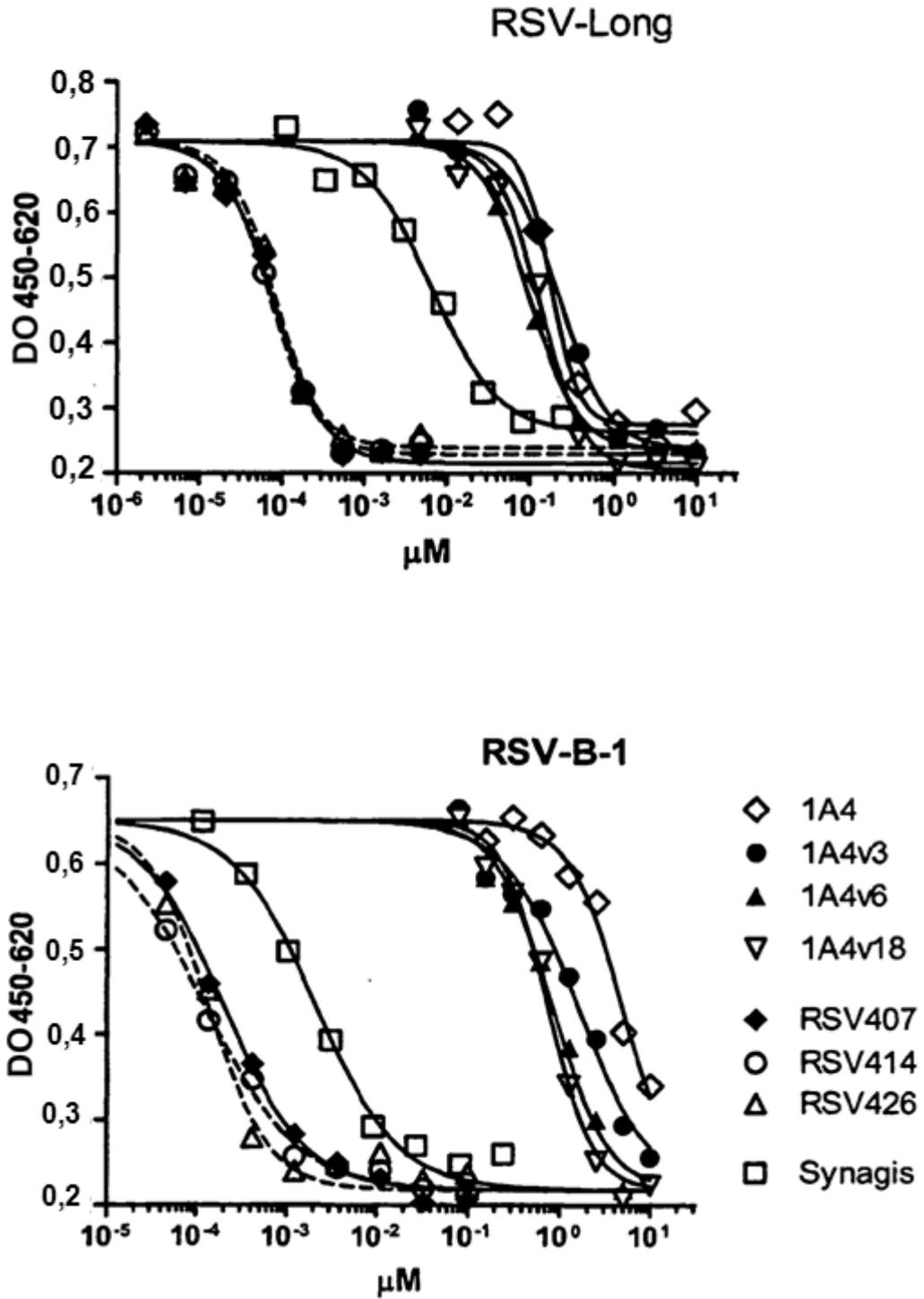
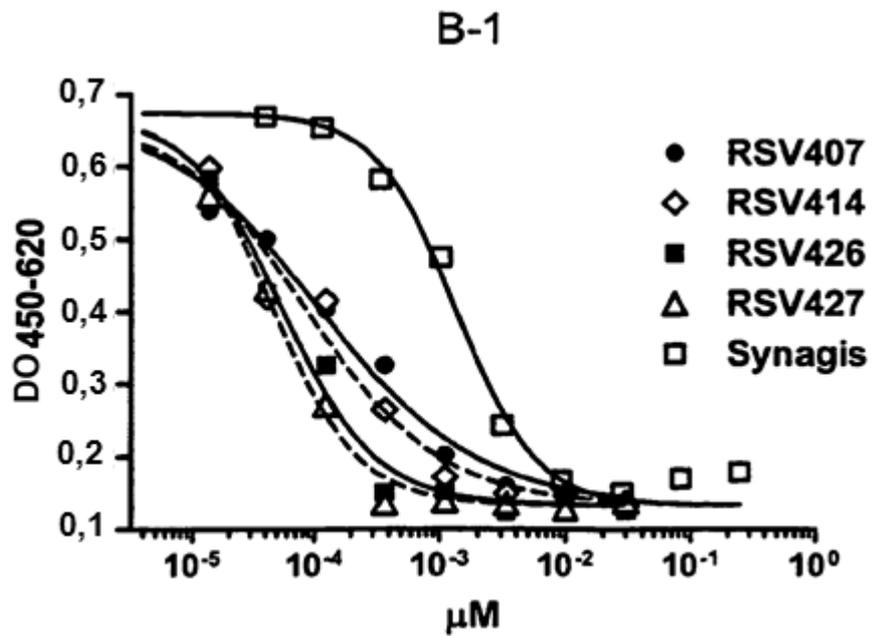
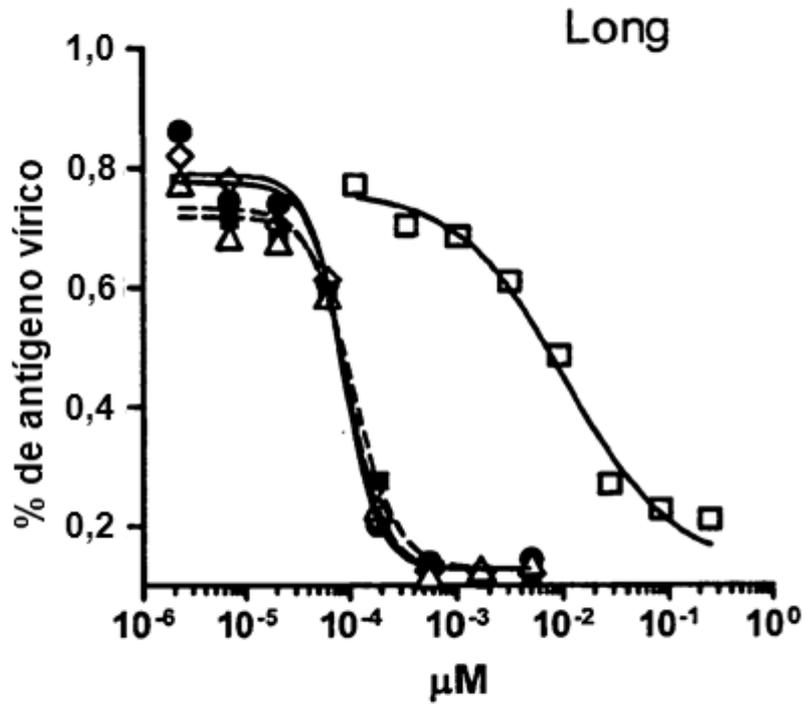


Figura 8B



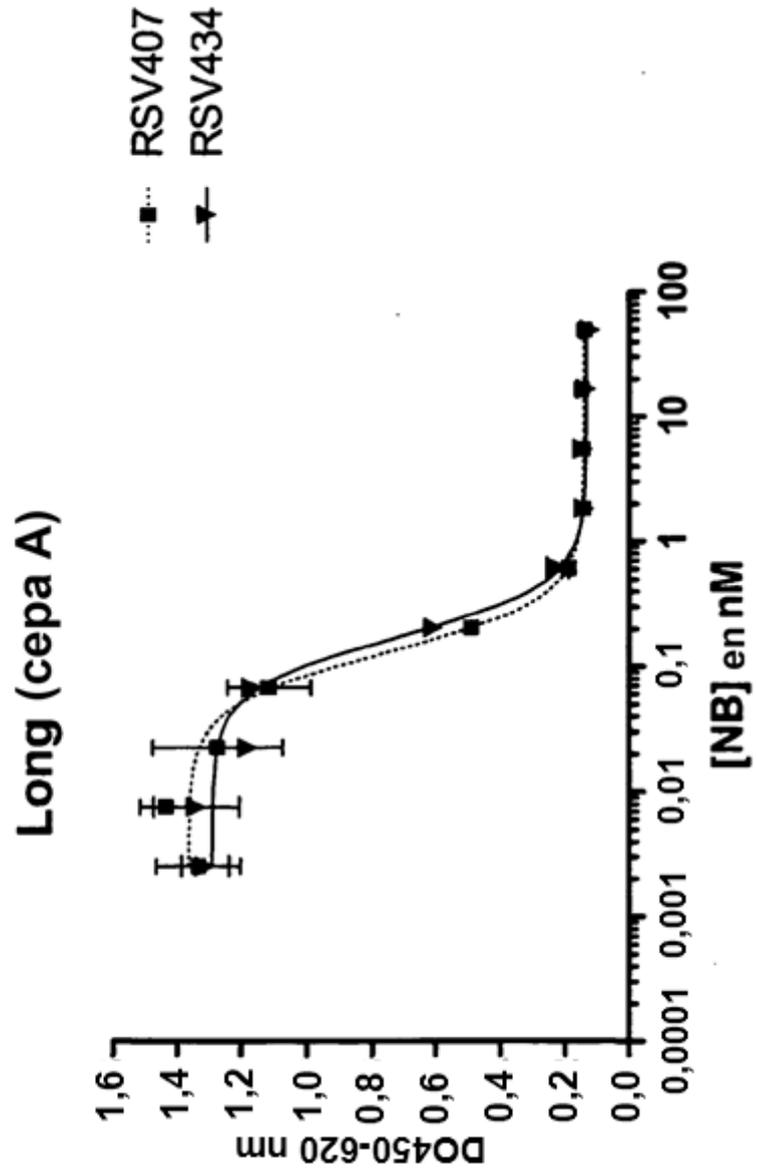


Figura 9A

Cepa B

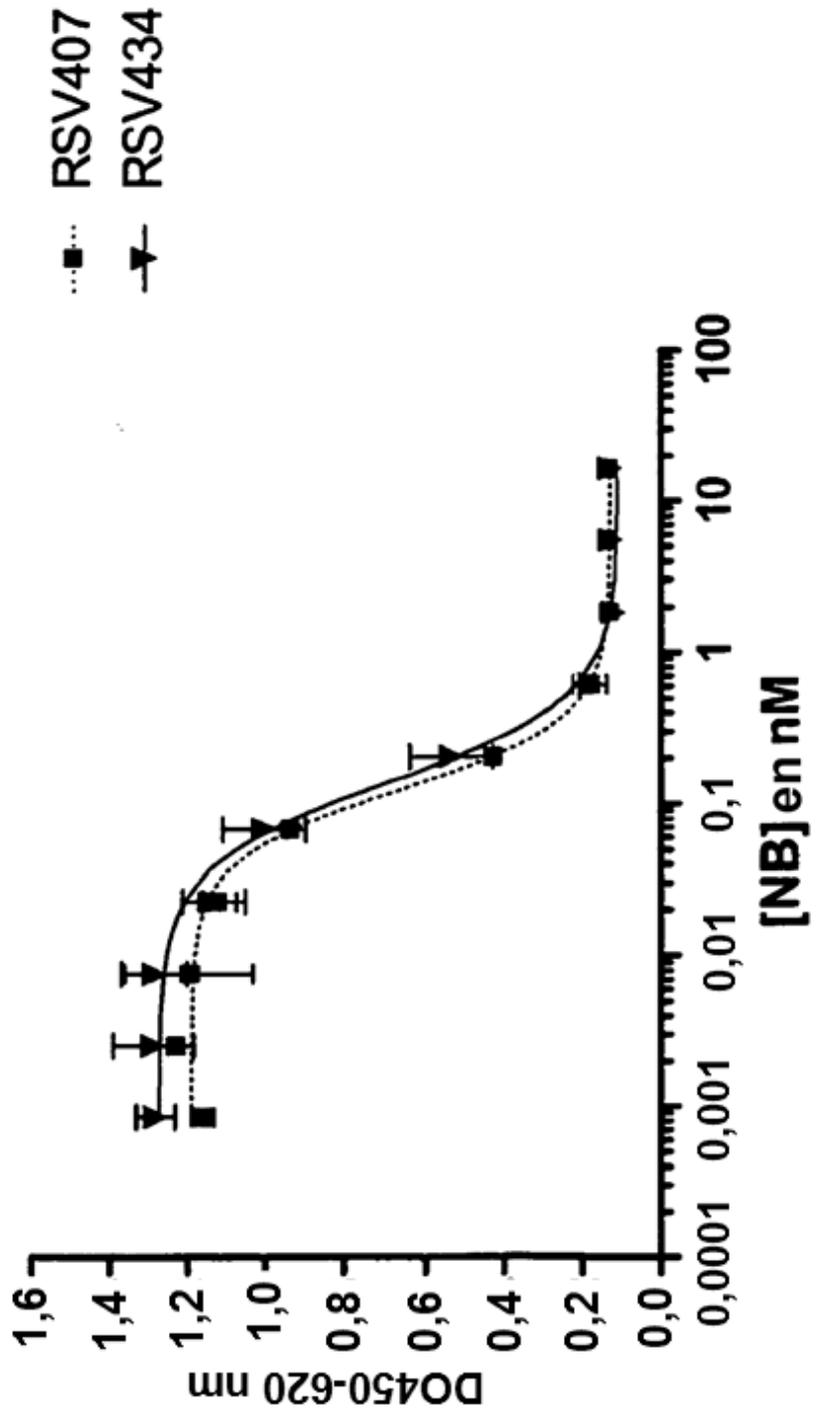


Figura 9B

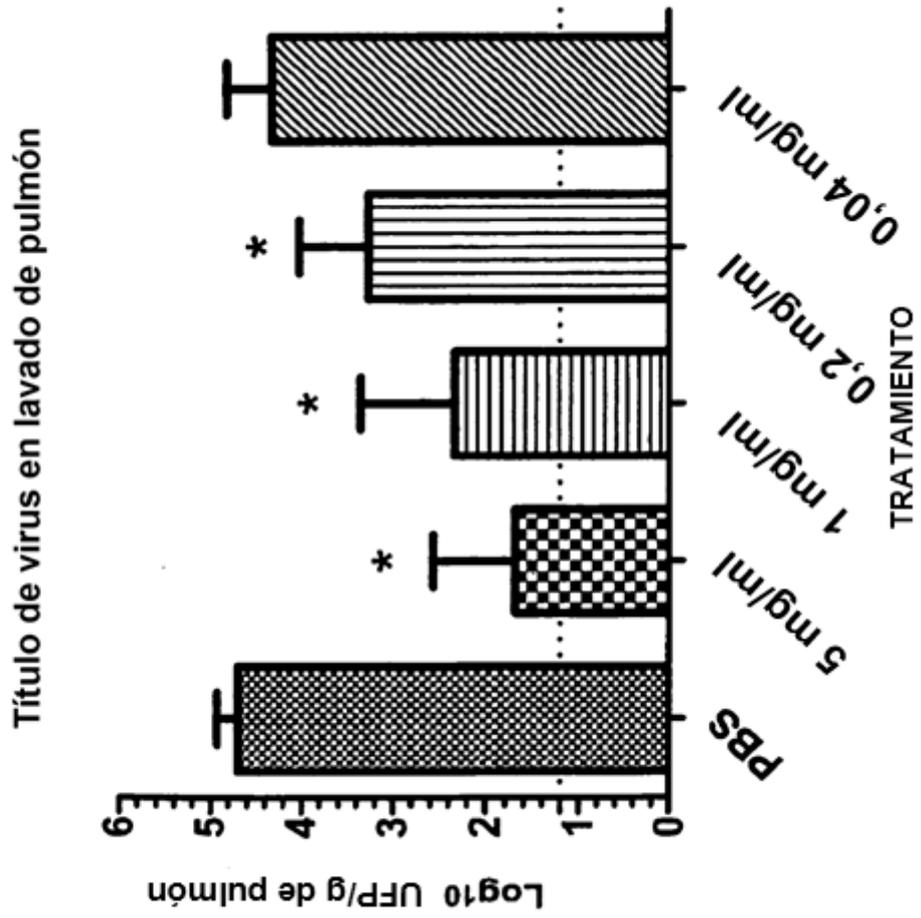


Figura 10A

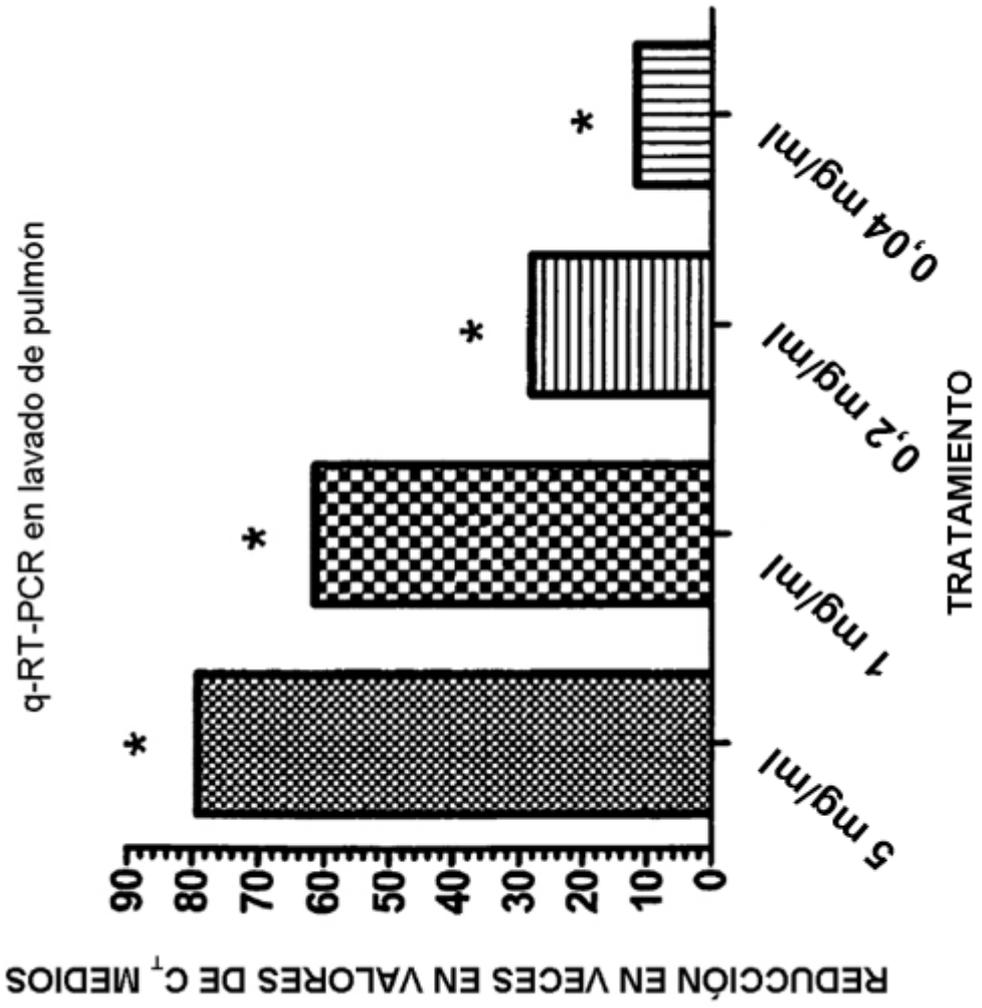


Figura 10B

Figura 11A

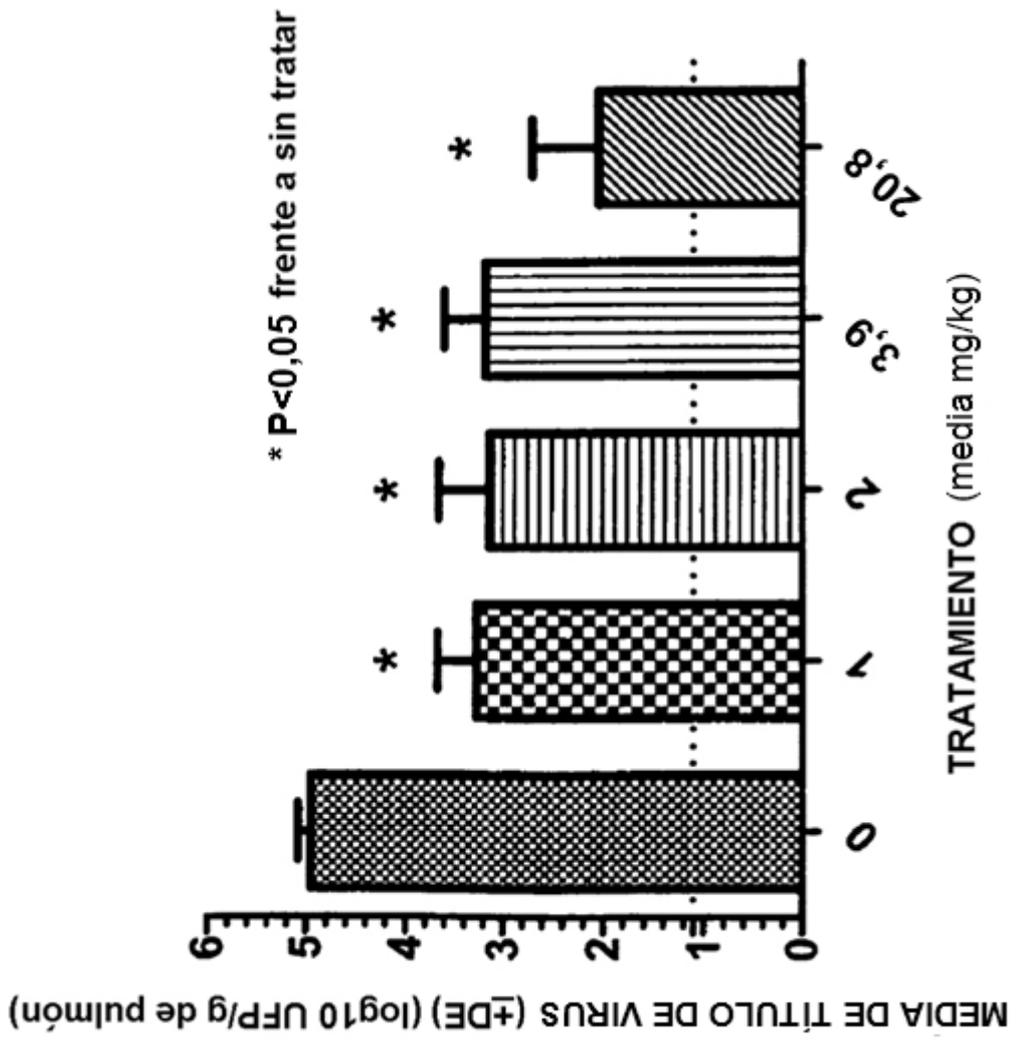


Figura 11B

