

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 912**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
G01N 33/577	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2003 E 10182757 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2390268**

54 Título: **Anticuerpos de dominio simple dirigidos contra factor de necrosis tumoral-alfa y usos para los mismos**

30 Prioridad:

08.11.2002 US 425073 P
 08.11.2002 US 425063 P
 10.01.2003 EP 03447005
 23.06.2003 WO PCT/EP03/06581
 08.07.2003 WO PCT/EP03/07313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SILENCE, KAREN;
LAUWEREYS, MARC y
DE HAARD, HANS

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 655 912 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

Anticuerpos de dominio simple dirigidos contra factor de necrosis tumoral-alfa y usos para los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona polipéptidos que comprenden al menos dos anticuerpos de dominio simple dirigidos hacia el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) y al menos un anticuerpo de dominio simple dirigido contra una proteína sérica, en el que dicha proteína sérica es cualquiera de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. La presente invención se refiere además a su uso en terapia. Tales anticuerpos pueden tener una secuencia de entramado con alta homología con secuencias de entramado humanas. Se describen composiciones que comprenden anticuerpos frente al factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) solos o en combinación con otros fármacos.

15 **Antecedentes de la invención**

Se cree que el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) desempeña un papel importante en diversos trastornos, por ejemplo en trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y esclerosis múltiple. Tanto TNF-alfa como los receptores (CD120a, CD120b) se han estudiado en gran detalle. TNF-alfa en su forma bioactiva es un trímero y la ranura formada por subunidades vecinas es importante para la interacción citocina-receptor. Se han desarrollado varias estrategias para antagonizar la acción de la citocina y se usan actualmente para tratar diversos estados patológicos.

Un inhibidor de TNF-alfa que tiene suficiente especificidad y selectividad frente a TNF-alfa puede ser un compuesto farmacéutico profiláctico o terapéutico eficaz para prevenir o tratar trastornos en los que se ha implicado a TNF-alfa como agente causante. El documento WO 91/02078 describe anticuerpos de cuatro cadenas convencionales producidos contra TNF-alfa. Se han descrito métodos de tratamiento de choque tóxico (documento EP 486526), regresión tumoral, inhibición de la citotoxicidad (documentos US 6448380, US 6451983, US 6498237), enfermedad autoinmunitaria tal como AR y enfermedad de Crohn (documentos EP 663836, US 5672347, US 5656272), reacción de injerto contra huésped (documento US 5672347), meningitis bacteriana (documento EP 585705) por medio de un anticuerpo frente a TNF-alfa.

Aun así, ninguno de los fármacos disponibles actualmente es completamente eficaz para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, y la mayoría están limitados por toxicidad grave. Además, es extremadamente difícil y es un proceso largo desarrollar una nueva entidad química (NCE) con suficiente potencia y selectividad frente a tal secuencia diana. Por otro lado, los agentes terapéuticos basados en anticuerpos tienen un potencial significativo como fármacos debido a que tienen una especificidad exquisita por su diana y una baja toxicidad inherente. Además, el tiempo de desarrollo puede reducirse considerablemente en comparación con el desarrollo de nuevas entidades químicas (NCE). Sin embargo, es difícil generar anticuerpos convencionales contra proteínas multiméricas en las que el dominio de unión al receptor del ligando está incrustado en una ranura, como es el caso de TNF-alfa. Se sabe que anticuerpos de cadena pesada descritos en la invención que se derivan de camélidos tienen propensión a unirse a cavidades (documento WO97/49805; Lauwereys *et al*, EMBO J. 17, 5312, 1998)). Por tanto, tales anticuerpos de cadena pesada son inherentemente adecuados para unirse a dominios de unión a receptor de ligandos tales como TNF. Además, se sabe que tales anticuerpos son estables a lo largo de periodos de tiempo prolongados, aumentando así su vida útil (Perez *et al*, Biochemistry, 40, 74, 2001). Además, tales fragmentos de anticuerpos de cadena pesada pueden producirse "en masa" en fermentadores usando sistemas de expresión baratos en comparación con fermentación de cultivo de células de mamífero, tales como levaduras u otros microorganismos (documento EP 0 698 097).

El uso de anticuerpos derivados de fuentes tales como ratón, oveja, cabra, conejo etc., y derivados humanizados de los mismos como tratamiento para estados que requieren una modulación de la inflamación es problemático por varios motivos. Los anticuerpos tradicionales no son estables a temperatura ambiente, y tienen que refrigerarse para su preparación y almacenamiento, lo que requiere equipo de laboratorio, almacenamiento y transporte refrigerados necesariamente, lo que contribuye al tiempo y al gasto. Algunas veces no es viable la refrigeración en países en desarrollo. Además, la fabricación o producción a pequeña escala de dichos anticuerpos es cara porque los sistemas de células de mamíferos necesarios para la expresión de anticuerpos intactos y activos requieren altos niveles de apoyo en cuanto a tiempo y equipo, y los rendimientos son muy bajos. Además el gran tamaño de los anticuerpos convencionales restringiría la penetración en el tejido, por ejemplo, en el sitio de tejido inflamado. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende del pH, y por tanto no son adecuados para su uso en entornos fuera del intervalo de pH fisiológico habitual tal como, por ejemplo, en el tratamiento de hemorragia gástrica, cirugía gástrica. Además, los anticuerpos tradicionales son inestables a pH bajo o alto y por tanto no son adecuados para la administración oral. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos de camélidos resisten condiciones duras, tales como pH extremo, reactivos desnaturizantes y altas temperaturas (Dumoulin *et al*, Protein Science 11, 500, 2002), lo que los hace adecuados para su suministro mediante administración oral. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende de la temperatura, y por tanto no son adecuados para su uso en ensayos o kits realizados a temperaturas fuera de los

intervalos de temperatura biológicamente activa (por ejemplo $37 \pm 20^\circ\text{C}$).

Los agentes terapéuticos polipeptídicos y en particular agentes terapéuticos basados en anticuerpos tienen un potencial significativo como fármacos debido a que tienen una especificidad exquisita por su diana y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, el experto en la técnica sabe que un anticuerpo que se ha obtenido para una diana terapéuticamente útil requiere modificación adicional con el propósito de prepararlo para la terapia en humanos, de modo que se evite una reacción inmunológica no deseada en un individuo humano tras su administración al mismo. El proceso de modificación se denomina comúnmente "humanización". El experto en la técnica sabe que los anticuerpos generados en especies distintas de humanos requieren humanización para hacer que el anticuerpo sea terapéuticamente útil en humanos ((1) injerto de CDR: Protein Design Labs: Documentos US 6180370, US 5693761; Genentech documento US 6054297; Celltech: documentos 460167, EP 626390, US 5859205; (2) remodelación de la superficie: Xoma: documentos US 5869619, US 5766886, US 5821123). Hay una necesidad de un método para producir anticuerpos que evite el requisito de humanización sustancial, o que obvие completamente la necesidad de humanización. Hay una necesidad de una nueva clase de anticuerpos que tengan residuos de aminoácido o regiones de entramado definidos y que puedan administrarse a un sujeto humano sin el requisito de humanización sustancial, o la necesidad de humanización en absoluto.

Otra desventaja importante de los anticuerpos convencionales es que son moléculas grandes, complejas y por tanto son relativamente inestables, y son sensibles a la degradación por proteasas. Esto significa que los convencionales fármacos de anticuerpos convencionales no pueden administrarse por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación porque no son resistentes al pH bajo en estos sitios, a la acción de proteasas en estos sitios y en la sangre y/o debido a su gran tamaño. Tienen que administrarse mediante inyección (por vía intravenosa, por vía subcutánea, etc.) para superar alguno de estos problemas. La administración mediante inyección requiere entrenamiento del especialista con el propósito de usar una aguja o jeringa hipodérmica de manera correcta y segura. Requiere además equipo estéril, una formulación líquida del polipéptido terapéutico, envases de viales de dicho polipéptido en una forma estéril y estable y, del sujeto, un sitio adecuado para la entrada de la aguja. Además, los sujetos experimentan comúnmente estrés físico y psicológico antes y después de recibir una inyección. Por tanto, hay una necesidad de un método para la administración de polipéptidos terapéuticos que evite la necesidad de inyección que no solo ahorre coste/tiempo, sino que también sea más conveniente y más cómodo para el sujeto.

Los agentes terapéuticos basados en anticuerpos de dominio simple tienen un potencial significativo como fármacos debido a que tienen una especificidad exquisita por su diana y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, la mejora adicional de su afinidad intrínseca y funcional puede conducir a muchos beneficios para un paciente tal como dosis reducida de agente terapéutico, terapia más rápida y efectos secundarios reducidos.

Los objetivos de la presente invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar polipéptidos que comprenden uno o más anticuerpos de dominio simple que se unen a TNF-alfa, homólogos de dichos polipéptidos, porciones funcionales de homólogos de dichos polipéptidos. Dichos polipéptidos modifican la actividad biológica de TNF-alfa tras la unión. Tales polipéptidos podrían unirse en la ranura de unión a receptor de TNF-alfa, o podrían no unirse en la ranura de unión a receptor. Tales polipéptidos son anticuerpos de un solo dominio.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar anticuerpos de dominio simple que pueden ser cualquiera de la técnica, o cualquier anticuerpo de dominio simple futuro. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos que carecen de manera natural de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio simple derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, anticuerpos modificados por ingeniería genética y armazones de dominio simple distintos de los derivados de anticuerpos. Según un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio simple tal como se usa en el presente documento es un anticuerpo de dominio simple que se produce de manera natural conocido como anticuerpo de cadena pesada que carece de cadenas ligeras (documento WO 9404678). Por motivos de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada que carece de cadena ligera se denominará VHH o nanocuerpo para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Una molécula de VHH de este tipo puede derivarse de anticuerpos generados en especies de camélidos, por ejemplo en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un método de administración de polipéptidos anti-TNF-alfa por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

Un objetivo adicional de la invención es potenciar la afinidad de unión de anticuerpos de dominio simple monovalentes.

Sumario de la invención

La presente invención se describe en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende al menos dos anticuerpos de dominio simple anti-TNF-alfa y al menos un anticuerpo de dominio simple dirigido contra una proteína sérica, en el que dicha proteína sérica es cualquiera de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno.
- 10 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente en el que al menos un anticuerpo de dominio simple anti-TNF-alfa corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 16 y 79 a 84.
- 15 Otra realización descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente que comprende además al menos un anticuerpo de dominio simple dirigido contra una proteína sérica.
- 20 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente en el que dicha proteína sérica es cualquiera de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno.
- Otra realización descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente en el que un anticuerpo de dominio simple anti-proteína sérica de dominio simple corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 26 a 29 y 85 a 97.
- 25 Otra realización descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente que corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 30 a 43.
- 30 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente que comprende además al menos un anticuerpo de dominio simple seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo de dominio simple anti-IFN-gamma, anticuerpo de dominio simple anti-receptor de TNF-alfa y anticuerpo de dominio simple anti-receptor de IFN-gamma.
- 35 Otra realización descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, en el que el número de anticuerpos de dominio simple dirigidos contra TNF-alfa es de al menos dos.
- Otra realización descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente que corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 73 a 76.
- 40 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, en el que al menos un anticuerpo de dominio simple es un VHH de camélido humanizado.
- Otra realización descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente en el que un VHH de camélido humanizado corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 17 a 19 y 21 a 24.
- 45 Otra realización descrita en el presente documento es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente y al menos un anticuerpo de dominio simple del grupo que consiste en anticuerpo de dominio simple anti-IFN-gamma, anticuerpo de dominio simple anti-receptor de TNF-alfa y anticuerpo de dominio simple anti-receptor de IFN-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.
- 50 Otra realización descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, o una composición tal como se describió anteriormente en la que al menos un anticuerpo de dominio simple anti-IFN-gamma corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 44 a 72.
- 55 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, o una composición tal como se describió anteriormente en la que dicho anticuerpo de dominio simple es una secuencia homóloga, una porción funcional o una porción funcional de una secuencia homóloga del anticuerpo de dominio simple de longitud completa.
- 60 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, o una composición tal como se describió anteriormente, en el que el polipéptido anti-TNF-alfa es una secuencia homóloga, una porción funcional o una porción funcional de una secuencia homóloga del polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa.
- 65 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, o una composición tal como se describió anteriormente, en el que al menos un anticuerpo de dominio simple es un VHH de camélido.

Otra realización de la presente invención es un ácido nucleico que codifica para un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente.

5 Otra realización descrita en el presente documento es un método de identificación de un agente que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente a factor de necrosis tumoral-alfa que comprende las etapas de:

10 (a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente con una diana que es factor de necrosis tumoral-alfa, en presencia y ausencia de un modulador candidato en condiciones que permiten la unión entre dicho polipéptido y la diana, y

15 (b) medir la unión entre el polipéptido y la diana de la etapa (a), en el que una disminución en la unión en presencia de dicho modulador candidato, en relación con la unión en ausencia de dicho modulador candidato identificó a dicho modulador candidato como agente que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente y factor de necrosis tumoral-alfa.

20 Otra realización descrita en el presente documento es un método de identificación de un agente que modula trastornos mediados por factor de necrosis tumoral-alfa a través de la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente a factor de necrosis tumoral-alfa que comprende:

(a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente con una diana que es factor de necrosis tumoral-alfa, en presencia y ausencia de un modulador candidato en condiciones que permiten la unión entre dicho polipéptido y la diana, y

25 (b) medir la unión entre el polipéptido y la diana de la etapa (a), en el que una disminución en la unión en presencia de dicho modulador candidato, en relación con la unión en ausencia de dicho modulador candidato identificó a dicho modulador candidato como agente que modula trastornos mediados por factor de necrosis tumoral-alfa.

30 Otra realización descrita en el presente documento es un método de identificación de un agente que modula la unión de factor de necrosis tumoral-alfa a su receptor a través de la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente a factor de necrosis tumoral-alfa que comprende:

35 (a) poner en contacto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente con una diana que es factor de necrosis tumoral-alfa, en presencia y ausencia de un modulador candidato en condiciones que permiten la unión entre dicho polipéptido y la diana, y

40 (b) medir la unión entre el polipéptido y la diana de la etapa (a), en el que una disminución en la unión en presencia de dicho modulador candidato, en relación con la unión en ausencia de dicho modulador candidato identificó a dicho modulador candidato como agente que modula la unión de factor de necrosis tumoral-alfa a su receptor.

Otra realización descrita en el presente documento es un kit para detectar agentes que modulan trastornos mediados por factor de necrosis tumoral-alfa que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente y factor de necrosis tumoral-alfa.

45 Otra realización descrita en el presente documento es un agente desconocido que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente a factor de necrosis tumoral-alfa, identificado según el método descrito anteriormente.

50 Otra realización descrita en el presente documento es un agente desconocido que modula trastornos mediados por factor de necrosis tumoral-alfa, identificados según los métodos descritos anteriormente.

55 Otra realización descrita en el presente documento es un agente desconocido tal como se describió anteriormente en el que dichos trastornos son uno o más de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, o un ácido nucleico tal como se describió anteriormente, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención y/o alivio de trastornos relacionados con procesos inflamatorios.

60 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, o un ácido nucleico tal como se describió anteriormente, o una composición tal como se describió anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con reacciones inflamatorias.

65 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención y/o alivio

de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través del entorno gástrico sin que la sustancia se inactive.

5 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que puede pasar a través del entorno gástrico sin que la sustancia se inactive.

10 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención y/o alivio de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada al tracto vaginal y/o rectal.

15 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente una composición tal como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada al tracto vaginal y/o rectal.

20 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención y/o alivio de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón.

25 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón.

30 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención y/o alivio de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

35 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

40 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención y/o alivio de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de los tejidos de debajo de la lengua eficazmente.

45 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de los tejidos de debajo de la lengua eficazmente.

50 Otra realización de la invención descrita en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de la piel eficazmente.

55 Otra realización descrita en el presente documento es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de la piel eficazmente.

60 Otra realización de la presente invención es un ácido nucleico o, un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, para su uso en un método para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con procesos inflamatorios, en los que dichos trastornos son cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, diabetes tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esterilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis,

esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

5 Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un ácido nucleico tal como se describió anteriormente, un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, y un vehículo farmacéutico adecuado.

Otra realización descrita en el presente documento es un método de diagnóstico de un trastorno caracterizado por la disfunción de factor de necrosis tumoral-alfa que comprende:

- 10 (a) poner en contacto una muestra con un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente,
- (b) detectar la unión de dicho polipéptido a dicha muestra, y
- 15 (c) comparar la unión detectada en la etapa (b) con un patrón, en el que una diferencia en la unión en relación a dicha muestra es diagnóstico de un trastorno caracterizado por disfunción de factor de necrosis tumoral-alfa.

Otra realización descrita en el presente documento es un kit para detectar un trastorno tal como se mencionó anteriormente, usando un método tal como se describió anteriormente.

20 Otra realización descrita en el presente documento es un kit para detectar un trastorno tal como se mencionó anteriormente que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa aislado tal como se describió anteriormente.

Otra realización descrita en el presente documento es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente para la purificación de dicho factor de necrosis tumoral-alfa.

25 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente para inhibir la interacción entre factor de necrosis tumoral-alfa y uno o más receptores de factor de necrosis tumoral-alfa.

30 Otra realización descrita en el presente documento es un método para producir un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente que comprende las etapas de:

- (a) obtener ADN bicatenario que codifica para un VHH de camélido dirigido a factor de necrosis tumoral-alfa,
- 35 (b) clonar y expresar el ADN seleccionado en la etapa (b).

Otra realización descrita en el presente documento es un método de producción de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente que comprende:

- 40 (a) cultivar células huésped que comprenden ácido nucleico capaz de codificar para un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, en condiciones que permiten la expresión del polipéptido, y,
- (b) recuperar el polipéptido producido del cultivo.

45 Otra realización descrita en el presente documento es un método tal como se describió anteriormente, en el que dichas células huésped son bacterianas o de levadura.

Otra realización descrita en el presente documento es un kit para detectar cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino o esclerosis múltiple que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente.

50 **Breve descripción de figuras y tablas**

Figura 1. Alineación de VHH anti-TNF humano tal como se describe en el ejemplo 1.

55 Figura 2. Series de dilución de VHH anti-TNF-alfa humano tal como se somete a prueba en ELISA según el ejemplo 1.

Figura 3. Efecto antagonista de VHH tal como se determina en ensayo de citotoxicidad usando la línea celular humana KYM según el ejemplo 1.

Figura 4. Ensayo de unión a receptor *in vitro* de VHH#12B de tipo natural y A74S+Y76N+K83R+P84A mutante.

Figura 5. Ensayo de unión a receptor *in vitro* de VHH#12B de tipo natural y 1E + Q5LA74S + Y76N + K83R + P84A mutante.

65

Figura 6. Unión en ELISA de VHH#3E de tipo natural y VHH mutantes.

Figura 7. Ensayo de unión a receptor *in vitro* de VHH#3E de tipo natural y VHH mutantes.

5 Figura 8. Alineación de anticuerpos antagonistas anti-TNF de ratón tal como se describe en el ejemplo 3.

Figura 9. Efecto antagonista de VHH anti-TNF de ratón tal como se determina en ensayo de citotoxicidad usando la línea celular murina L929 según el ejemplo 3.

10 Figura 10. Inserto de EcoRI - HindIII del vector pAX11 (estructura principal de pUC119) para la producción de VHH bivalente o biespecífico.

Figura 11. PAGE teñida con Coomassie (15%) de VHH anti-TNFa purificado por IMAC mono (carril 8), bi (carril 1), tri (carriles 2, 3 y 5) y tetravalente (carriles 4, 6 y 7).

15 Figura 12. Cromatograma del análisis mediante filtración en gel en Superdex 75HR del VHH mono, bi, tri y tetravalente.

Figura 13. Comparación de las características antagonistas de la forma mono, bi, tri y tetravalente del VHH anti-TNF humano con los productos usados clínicamente Remicade y Enbrel.

20 Figura 14. Comportamiento antagonista del VHH mono y bivalentes dirigidos contra TNF-alfa de ratón.

Figura 15. PAGE teñida con Coomassie de la fusión VHH-Fc derivada de IgG1 humana descrita en el ejemplo 4.

25 Figura 16. Eficacia antagonista de la fusión VHH-Fc derivada de VHH#3E en comparación con el formato bivalente de VHH#3E tal como se determina en bioensayo.

Figura 17. ELISA de TNF3E de referencia y tratado con pepsina a pH 2,2, pH 3,2 y pH 4,2 (el 100% es la señal medida a una dilución 1/100).

30 Figura 18. Entorno experimental.

Tabla 1. Lista de secuencias de aminoácidos de los péptidos de aspectos de presente invención dirigidos contra TNF-alfa.

Tabla 2. Lista de reacciones de mutagénesis, cebadores mutagénicos y moldes usados para la mutagénesis de VHH#12B.

40 Tabla 3. Lista de reacciones de mutagénesis, cebadores mutagénicos y moldes usados para la mutagénesis de VHH#3E.

Tabla 4. Visión general de VHH humanizado y de tipo natural.

45 Tabla 5. Anticuerpos anti-albúmina sérica de ratón/anti-TNF-alfa.

Tabla 6. Lista de secuencias de aminoácidos de VHH dirigidos contra IFN-gamma humano.

50 Tabla 7. Secuencias de VHH bivalente (BIV 3E, BIV#m3F), trivalente (TRI3E) o tetravalente (TETRA 3E) dirigido contra TNF-alfa.

Tabla 8. Homologías fraccionales entre las secuencias de aminoácidos de VHH anti-albúmina sérica de ratón de la invención.

55 Tabla 9. Homologías fraccionales entre VHH anti-TNF-alfa de la invención.

Tabla 10. Porcentajes de homología entre VHH anti-IFN-gamma de la invención.

60 Tabla 11. Programa de tratamiento.

Descripción detallada

65 La presente invención se refiere a un polipéptido anti-factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) que comprende al menos dos anticuerpos de dominio simple que se dirigen contra TNF-alfa y al menos un anticuerpo de dominio simple dirigido contra una proteína sérica, en el que dicha proteína sérica es cualquiera de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. La invención también se refiere a

ácidos nucleicos capaces de codificar para dichos polipéptidos.

Los anticuerpos de dominio simple son anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad son parte de un polipéptido de un solo dominio. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos que carecen de manera natural de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio simple derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, anticuerpos modificados por ingeniería genética y armazones de dominio simple distintos de los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio simple pueden ser cualquiera de la técnica, o cualquier anticuerpo de dominio simple futuro. Los anticuerpos de dominio simple pueden derivarse de cualquier especie incluyendo, pero sin limitarse a ratón, humano, camello, llama, cabra, conejo, bovino. Según un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio simple tal como se usa en el presente documento es un anticuerpo de dominio simple que se produce de manera natural conocido como anticuerpo de cadena pesada que carece de cadenas ligeras. Tales anticuerpos de dominio simple se divulgan en el documento WO 94/04678 por ejemplo. Por motivos de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada que carece de manera natural de cadena ligera se conoce en el presente documento como VHH o nanocuerpo para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Una molécula de VHH de este tipo puede derivarse de anticuerpos generados en especies de camélidos, por ejemplo en camello, dromedario, llama, alpaca y guanaco. Otras especies además de camélidos pueden producir anticuerpos de cadena pesada que carecen de manera natural de cadena ligera; tales VHH están dentro del alcance de la invención.

Los VHH, según la presente invención, y tal como conoce el experto en la técnica son dominios variables de cadena pesada derivados de inmunoglobulinas que carecen de manera natural de cadenas ligeras tales como las derivadas de camélidos tal como se describe en el documento WO 94/04678 (y denominados a continuación en el presente documento dominios de VHH o nanocuerpos). Las moléculas de VHH son aproximadamente 10x más pequeñas que las moléculas de IgG. Son polipéptidos individuales y muy estables, resistiendo condiciones de pH y temperatura extremas. Además, son resistentes a la acción de proteasas, lo que no es el caso de los anticuerpos convencionales. Además, la expresión *in vitro* de VHH produce VHH funcionales plegados apropiadamente, con alto rendimiento. Además, los anticuerpos generados en camélidos reconocerán epítopos distintos de los reconocidos por anticuerpos generados *in vitro* a través del uso de bibliotecas de anticuerpos o por medio de inmunización de mamíferos distintos de camélidos (documento WO 9749805). Como tales, los VHH anti-TNF-alfa pueden interactuar más eficazmente con TNF-alfa que los anticuerpos convencionales, bloqueando de ese modo su interacción con el receptor de TNF-alfa más eficazmente.

Según la invención, TNF-alfa se deriva de cualquier especie. Los ejemplos de especies relevantes para la invención incluyen conejos, cabras, ratones, ratas, vacas, terneros, camellos, llamas, monos, asnos, cobayas, pollos, oveja, perros, gatos, caballos y preferiblemente humanos.

TNF-alfa también es un fragmento de TNF-alfa, capaz de provocar una respuesta inmunitaria. TNF-alfa también es un fragmento de TNF-alfa, capaz de unirse a un anticuerpo de dominio simple generado contra el TNF-alfa de longitud completa.

Un anticuerpo de dominio simple dirigido contra TNF-alfa significa un anticuerpo de dominio simple capaz de unirse a TNF-alfa con una afinidad mejor que 10^{-6} M.

Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF, en el que los anticuerpos de dominio simple comprenden VHH de camélidos dirigido contra TNF-alfa.

Los al menos dos anticuerpos de dominio simple del polipéptido anti-TNF que se dirigen contra TNF-alfa pueden ser de la misma secuencia. Alternativamente, pueden no tener todos la misma secuencia. Está dentro del alcance de la invención que un polipéptido anti-TNF comprende anticuerpos de dominio simple anti-TNF-alfa que no comparten todos la misma secuencia, pero que se dirigen contra la misma diana, uno o más antígenos de la misma.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa, en el que un anticuerpo de dominio simple corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 16 y 79 a 84 tal como se muestra en la tabla 1. Dichas secuencias se derivan de anticuerpos de cadena pesada (VHH) de camélidos que se dirigen contra TNF-alfa.

La presente invención se refiere además a un polipéptido anti-TNF-alfa, en el que dicho anticuerpo de dominio simple es un VHH dirigido contra TNF-alfa, en el que el VHH pertenece a una clase que tiene secuencias de tipo humano. La clase se caracteriza porque los VHH portan un aminoácido del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, treonina, asparagina o glutamina en la posición 45, tal como, por ejemplo, L45 y un triptófano en la posición 103, según la numeración de Kabat. La nueva clase anticuerpos de dominio simple de camélidos descrita en esta invención (tabla 1, ejemplo 1) se representa por VHH#2B (SEQ ID NO: 3) y VHH#12B (SEQ ID NO: 14) que contienen los residuos hidrófobos en FR2 en combinación con el residuo hidrófobo triptófano en la posición 103.

Otra clase de tipo humano de anticuerpos de dominio simple de camélidos representados por las secuencias

VHH#1A (SEQ ID NO. 1), VHH#4B (SEQ ID NO. 12), VHH#8-29 (SEQ ID NO. 81), VHH#8-41 (SEQ ID NO. 82), VHH#8-42 (SEQ ID NO. 83) y VHH#8-44 (SEQ ID NO. 84) (tabla 1, ejemplo 1) se han descrito en el documento WO03035694 y contienen los residuos de FR2 hidrófobos que se encuentran normalmente en anticuerpos convencionales de origen humano o de otras especies, pero compensando está pérdida de hidrofiliidad por el residuo de arginina cargado en la posición 103 que sustituye al residuo de triptófano conservado presente en VH de anticuerpos de cadena doble. Como tales, los péptidos que pertenecen a estas dos clases muestran una homología de secuencia de aminoácidos alta con regiones de entramado de VH humanas y dichos péptidos podrían administrarse a un humano directamente sin esperar una respuesta inmunitaria no deseada a partir de los mismos, y sin la carga de la humanización adicional. La invención también se refiere a ácidos nucleicos capaces de codificar para dichos polipéptidos.

Por tanto, un aspecto de la presente invención permite el uso en un método de administración de un polipéptido anti-TNF-alfa, en el que los anticuerpos de dominio simple pertenecen a la clase humanizada de VHH, y comprenden una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 12, 14, 81, 82, 83 y 84 a un paciente que necesita del mismo.

Cualquiera de los VHH usados por la invención puede ser de la clase tradicional o de las clases de anticuerpos de camélidos de tipo humano. Dichos anticuerpos pueden dirigirse contra todo el TNF-alfa o un fragmento del mismo, o un fragmento de una secuencia homóloga del mismo. Estos polipéptidos incluyen los anticuerpos de camélidos de longitud completa, concretamente dominios Fc y VHH, versiones quiméricas de anticuerpos de camélidos de cadena pesada con un dominio Fc humano o VHH por sí mismos o fragmentos derivados.

Los VHH anti-albúmina sérica pueden interactuar de un modo más eficaz con albúmina sérica que anticuerpos convencionales que se sabe que es una proteína portadora. Como proteína portadora, algunos de los epítomos de la albúmina sérica pueden ser inaccesibles para proteínas, péptidos y compuestos químicos pequeños unidos. Puesto que se sabe que los VHH se unen a epítomos "poco comunes" o no convencionales tales como cavidades (documento WO 97/49805), la afinidad de tales VHH por la albúmina circulante puede aumentar.

La presente invención también se refiere al hallazgo de que un polipéptido anti-TNF descrito en el presente documento que comprende además uno o más anticuerpos de dominio simple dirigidos contra una o más proteínas séricas de un sujeto, tiene sorprendentemente una semivida significativamente prolongada en la circulación de dicho sujeto en comparación con la semivida del anticuerpo de dominio simple anti-TNF-alfa cuando no es parte de dicho constructo. Se representan ejemplos de tales polipéptidos en la tabla 5 mediante SEQ ID NO: 30 a 43. Además, se encontró que dichos polipéptidos presentan las mismas propiedades favorables de anticuerpos de dominio simple tales como alta estabilidad permaneciendo intactos en ratones, resistencia a pH extremo, estabilidad a alta temperatura y alta afinidad por la diana.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende además uno o más anticuerpos de dominio simple dirigidos contra una o más proteínas séricas, comprendiendo dicho polipéptido anti-TNF-alfa una secuencia correspondiente a cualquiera representada por SEQ ID NO: 30 a 43 (tabla 5).

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa, en el que un anticuerpo de dominio simple anti-proteína sérica corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 26 a 29 y 85 a 97 tal como se muestra en la tabla 5.

La proteína sérica puede ser cualquier proteína adecuada que se encuentre en el suero del sujeto. En un aspecto de la invención, la proteína sérica es albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. Dependiendo del uso previsto tal como la semivida requerida para el tratamiento y/o la compartimentalización eficaces del antígeno diana, la pareja de VHH puede dirigirse a una de las proteínas séricas anteriores.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento que comprende además al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido anti-IFN-gamma, un polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma.

Es una realización descrita en el presente documento que un anticuerpo de dominio simple dirigido contra IFN-gamma corresponda a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 44 a 72 tal como se muestra en la tabla 6.

Según un aspecto de la divulgación, un anticuerpo de dominio simple se dirige contra el receptor de TNF-alfa. Dicho anticuerpo de dominio simple puede ser un VHH de camélido.

Según un aspecto descrito en el presente documento, un anticuerpo de dominio simple se dirige contra el receptor de IFN-gamma. Dicho anticuerpo de dominio simple puede ser un VHH de camélido.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un método de tratamiento de una enfermedad o condición

autoinmunitaria tal como se menciona en el presente documento, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende además al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma, tales polipéptidos unidos entre sí tal como se describe más adelante.

5 Tales constructos multiespecíficos pueden tener una potencia mejorada como compuesto terapéutico inflamatorio con respecto a constructos mono-específicos.

10 Un aspecto descrito en el presente documento es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.

15 Un aspecto de la invención es el uso en un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de un polipéptido anti-TNF-alfa y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma, simultáneamente, por separado o secuencialmente.

20 Otro aspecto descrito en el presente documento es un kit que contiene un polipéptido anti-TNF-alfa y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto. También se divulga que el kit puede usarse según la invención. También se divulga que el kit puede usarse para tratar las enfermedades mencionadas en el presente documento.

25 Por administración simultánea quiere decirse que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo. Por ejemplo, como una mezcla de los polipéptidos o una composición que comprende dichos polipéptidos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a una disolución administrada por vía intravenosa, un comprimido, líquido, crema tópica, etc., en el que cada preparación comprende los polipéptidos de interés.

30 Por administración separada quiere decirse que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo. Los polipéptidos están presentes en el kit como preparaciones separadas, no mezcladas. Por ejemplo, los diferentes polipéptidos pueden estar presentes en el kit como comprimidos individuales. Los comprimidos pueden administrarse al sujeto tragando ambos comprimidos al mismo tiempo, o un comprimido directamente tras el otro.

35 Por administración secuencial quiere decirse que los polipéptidos se administran a un sujeto secuencialmente. Los polipéptidos están presentes en el kit como preparaciones separadas, no mezcladas. Hay un intervalo de tiempo entre las dosis. Por ejemplo, un polipéptido podría administrarse hasta 336, 312, 288, 264, 240, 216, 192, 168, 144, 120, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1 ó 0,5 horas después del otro componente.

40 En la administración secuencial, puede administrarse un polipéptido una vez, o cualquier número de veces y en diversas dosis antes y/o después de la administración de otro polipéptido. La administración secuencial puede combinarse con la administración simultánea o secuencial.

45 Los usos médicos del polipéptido anti-TNF-alfa descritos más adelante también se aplican a la composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa divulgado en el presente documento y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto tal como se divulgó en el presente documento anteriormente.

50 Según un aspecto de la divulgación, un polipéptido anti-IFN-gamma anti-TNF-alfa un anticuerpo de dominio simple dirigido contra IFN-gamma. Dicho anticuerpo de dominio simple puede ser un VHH de camélido.

55 Una realización de la divulgación es que un anticuerpo de dominio simple dirigido contra IFN-gamma corresponda a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 44 a 72 tal como se muestra en la tabla 6.

Según un aspecto de la invención, anti-TNF-alfa un anticuerpo de dominio simple dirigido contra el receptor de TNF-alfa. Dicho anticuerpo de dominio simple puede ser un VHH de camélido.

60 Según un aspecto de la divulgación, un polipéptido anti-receptor de IFN-gamma anti-TNF-alfa un anticuerpo de dominio simple dirigido contra el receptor de IFN-gamma. Dicho anticuerpo de dominio simple puede ser un VHH de camélido.

65 En la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento, el número de anticuerpos de dominio simple dirigidos contra TNF-alfa es de dos o más. Tales polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen la ventaja de una afinidad funcional inusualmente alta por la diana, presentando propiedades

inhibidoras mucho más altas de lo esperado en comparación con sus homólogos monovalentes.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen afinidades funcionales que son varios órdenes de magnitud más altos que las de los polipéptidos anti-TNF-alfa originales monovalentes. Los inventores han encontrado que las afinidades funcionales de estos polipéptidos multivalentes son mucho más altas que las notificadas en la técnica anterior para anticuerpos bivalentes y multivalentes. Sorprendentemente, los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención unidos entre sí directamente (SEQ ID No. 77 y 78) o por medio de una secuencia de ligador corta muestran las altas afinidades funcionales esperadas teóricamente con anticuerpos de cuatro cadenas convencionales multivalentes.

Los inventores han encontrado que tales actividades funcionales enormemente aumentadas pueden detectarse preferiblemente con antígenos compuestos por proteínas multiméricas y de múltiples dominios, o bien en ensayos de unión directa o bien en ensayos funcionales, por ejemplo ensayos de citotoxicidad.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento, en el que el número de anticuerpos de dominio simple dirigidos contra TNF-alfa es de dos o más, comprendiendo dicho polipéptido anti-TNF-alfa una secuencia correspondiente a cualquiera representada por SEQ ID NO: 73 a 76.

Los anticuerpos de dominio simple pueden unirse para formar cualquiera de los polipéptidos divulgados en el presente documento que comprenden más de un anticuerpo de dominio simple usando métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden fusionarse mediante reticulación química haciendo reaccionar residuos de aminoácido con un agente de derivatización orgánico tal como se describe por Blattler *et al*, *Biochemistry* 24,1517-1524; documento EP294703. Alternativamente, el anticuerpo de dominio simple puede fusionarse genéticamente al nivel del ADN, es decir un constructo de polinucleótido formado que codifica para el constructo de polipéptido completo que comprende uno o más anticuerpos de dominio simple anti-diana y uno o más anticuerpos de dominio simple anti-proteína sérica. Se divulga un método para producir constructos de polipéptido VHH bivalente o multivalente en la solicitud de patente PCT WO 96/34103. Un modo de unir múltiples anticuerpos de dominio simple es por medio de la ruta genética uniendo secuencias que codifican para un anticuerpo de dominio simple o bien directamente o bien por medio de un ligador peptídico. Por ejemplo, el extremo C-terminal del primer anticuerpo de dominio simple puede unirse al extremo N-terminal del siguiente anticuerpo de un solo dominio. Este modo de unión puede extenderse con el propósito de unir anticuerpos de dominio simple adicionales para la construcción y producción de constructos tri, tetra, etc. funcionales.

Según un aspecto de la presente invención, los anticuerpos de dominio simple se unen entre sí directamente, sin el uso de un ligador. Al contrario que unir anticuerpos convencionales voluminosos en los que es necesario una secuencia de ligador para retener la actividad de unión en las dos subunidades, los polipéptidos de la invención pueden unirse directamente (SEQ ID No. 77 y 78) evitando de ese modo posibles problemas de la secuencia de ligador, tal como antigenicidad cuando se administra a un sujeto humano, inestabilidad de la secuencia de ligador que conduce a disociación de las subunidades.

Según otro aspecto de la presente invención los anticuerpos de dominio simple se unen entre sí por medio de una secuencia de ligador peptídico. Tal secuencia de ligador puede ser una secuencia que se produce de manera natural o una secuencia que no se produce de manera natural. Se espera que la secuencia de ligador sea no inmunogénica en el sujeto al que se administra el polipéptido anti-TNF-alfa. La secuencia de ligador puede proporcionar suficiente flexibilidad al polipéptido anti-TNF-alfa multivalente, al mismo tiempo que es resistente a la degradación proteolítica. Un ejemplo no limitativo de una secuencia de ligador es una que puede derivarse de la región bisagra de los VHH descritos en el documento WO 96/34103.

Según otro aspecto de la invención, pueden unirse entre sí anticuerpos de dominio simple multivalentes que comprenden más de dos anticuerpos de dominio simple directamente o por medio de una secuencia de ligador. Tales constructos son difíciles de producir con anticuerpos convencionales y debido al impedimento estérico de las subunidades voluminosas, se perderá la funcionalidad o disminuirá enormemente en vez de aumentar considerablemente tal como se observa con los VHH de la invención en comparación con el constructo monovalente (véase la figura 12 para análisis de filtración en gel de tales constructos multivalentes de VHH).

Los constructos de polipéptido divulgados en el presente documento pueden prepararse por el experto en la técnica según métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden obtenerse VHH usando métodos conocidos en la técnica tal como inmunizando un camello y obteniendo hibridomas del mismo, o clonando una biblioteca de anticuerpos de dominio simple usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y selección posterior usando presentación en fago.

Según un aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa.

Según otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. Según un aspecto de la invención un polipéptido anti-TNF-alfa puede comprender una secuencia de un polipéptido anti-TNF-alfa.

5 Según un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio simple usado para formar un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser un anticuerpo de dominio simple completo (por ejemplo un VHH) o una secuencia homóloga del mismo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio simple usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de un anticuerpo de dominio simple completo. Según otro aspecto de la invención,
10 un anticuerpo de dominio simple usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de un anticuerpo de dominio simple completo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio simple usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un anticuerpo de dominio simple completo.

15 Tal como se usa en el presente documento, una secuencia homóloga de la presente invención puede comprender adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos, que no alteran sustancialmente las características funcionales de los polipéptidos de la invención. El número de deleciones o sustituciones de aminoácidos es preferiblemente de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70 aminoácidos.

20 Una secuencia homóloga según la presente invención puede ser un polipéptido modificado por la adición, deleción o sustitución de aminoácidos, sin alterar sustancialmente dicha modificación las características funcionales en comparación con el polipéptido no modificado.

25 Una secuencia homóloga según la presente invención puede ser un polipéptido modificado por la adición, deleción o sustitución de aminoácidos, sin alterar sustancialmente dicha modificación las características funcionales en comparación con el polipéptido no modificado.

30 Una secuencia homóloga según la presente invención puede ser una secuencia que existe en otras especies de camélidos tales como, por ejemplo, camello, dromedario, llama, alpaca, guanaco, etc.

35 Cuando una secuencia homóloga indica identidad de secuencia, significa una secuencia que presenta una alta identidad de secuencia (identidad de secuencias de más del 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 98%) con la secuencia original y se caracteriza preferiblemente por propiedades similares de la secuencia original, concretamente afinidad, calculándose dicha identidad usando métodos conocidos.

Alternativamente, una secuencia homóloga también puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que resulte de sustituciones permitidas en cualquier número de posiciones de la secuencia original según la fórmula a continuación:

40 Ser sustituida por Ser, Thr, Gly y Asn;

Arg sustituida por uno de Arg, His, Gln, Lys y Glu;

45 Leu sustituida por una de Leu, Ile, Phe, Tyr, Met y Val;

Pro sustituida por una de Pro, Gly, Ala y Thr;

Thr sustituida por una de Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His y Gln;

50 Ala sustituida por una de Ala, Gly, Thr y Pro;

Val sustituida por una de Val, Met, Tyr, Phe, Ile y Leu;

Gly sustituida por una de Gly, Ala, Thr, Pro y Ser;

55 Ile sustituida por una de Ile, Met, Tyr, Phe, Val y Leu;

Phe sustituida por una de Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val y Leu;

60 Tyr sustituida por una de Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val y Leu;

His sustituida por una de His, Glu, Lys, Gln, Thr y Arg;

Gln sustituida por una de Gln, Glu, Lys, Asn, His, Thr y Arg;

65 Asn sustituida por uno de Asn, Glu, Asp, Gln y Ser;

Lys sustituida por uno de Lys, Glu, Gln, His y Arg;

Asp sustituido por uno de Asp, Glu y Asn;

5

Glu sustituido por uno de Glu, Asp, Lys, Asn, Gln, His y Arg;

Met sustituida por una de Met, Phe, Ile, Val, Leu y Tyr.

10 Una secuencia de nucleótidos homóloga según la presente invención puede referirse a secuencias de nucleótidos de más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ó 1000 nucleótidos capaces de hibridarse con la reversa-complementaria de la secuencia de nucleótidos capaz de codificar para la secuencia de la patente, en condiciones de hibridación rigurosas (tales como las descritas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory Press, Nueva York).

15 Tal como se usa en el presente documento, una porción funcional se refiere a una secuencia de un anticuerpo de dominio simple que tiene un tamaño suficiente de manera que la interacción de interés se mantiene con una afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.

20 Alternativamente, una porción funcional comprende una delección parcial de la secuencia de aminoácidos completa y todavía mantiene el/los sitio(s) de unión y el/los dominio(s) de proteína necesario(s) para la unión de y la interacción con la diana.

25 Tal como se usa en el presente documento, una porción funcional se refiere a menos del 100% de la secuencia completa (por ejemplo, el 99%, el 90%, el 80%, el 70%, el 60%, el 50%, el 40%, el 30%, el 20%, el 10%, el 5%, el 1%, etc.), pero comprende 5 o más aminoácidos o 15 o más nucleótidos.

30 Las dianas mencionadas en el presente documento tales como TNF-alfa, receptor de TNF-alfa, proteínas séricas (por ejemplo, albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina, fibrinógeno) e IFN-gamma, receptor de IFN-gamma pueden ser fragmentos de dichas dianas. Por tanto una diana también es un fragmento de dicha diana, que puede provocar una respuesta inmunitaria. Una diana también es un fragmento de dicha diana, que puede unirse a un anticuerpo de dominio simple generado contra la diana de longitud completa.

35 Un fragmento tal como se usa en el presente documento se refiere a menos del 100% de la secuencia (por ejemplo, el 99%, el 90%, el 80%, el 70%, el 60%, el 50%, el 40%, el 30%, el 20%, el 10%, etc.), pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. Un fragmento es de longitud suficiente de manera que la interacción de interés se mantiene con una afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.

40 Un fragmento tal como se usa en el presente documento también se refiere a inserciones, delecciones y sustituciones opcionales de uno o más aminoácidos que no alteran sustancialmente la capacidad de la diana para unirse a un anticuerpo de dominio simple generado contra la diana de tipo natural. El número de inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos es preferiblemente de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70 aminoácidos.

45 Una secuencia homóloga de la presente invención puede incluir un polipéptido anti-TNF-alfa que se ha humanizado. La humanización de anticuerpos de la nueva clase de VHH reduciría adicionalmente la posibilidad de una reacción inmunológica no deseada en un individuo humano tras su administración.

50 Una realización de la presente invención se refiere a un método para preparar polipéptidos modificados basados en anticuerpos de llama determinando los residuos de aminoácido del dominio variable de anticuerpo (VHH) que puede modificarse sin disminuir la afinidad nativa del dominio por el antígeno y al tiempo que se reduce su inmunogenicidad con respecto a una especie heteróloga; al uso de VHH que tienen modificaciones en los residuos identificados que son útiles para su administración a especies heterólogas; y al VHH así modificado.

55 Más específicamente, la invención se refiere a la preparación de VHH modificados, que están modificados para su administración a humanos, los propios VHH resultantes y el uso de tales VHH "humanizados" en el tratamiento de enfermedades en humanos. Por humanizado quiere decirse mutado de modo que la inmunogenicidad tras su administración en pacientes humanos es minoritaria o no existente. La humanización de un polipéptido, según la presente invención, comprende una etapa de reemplazar uno o más de los aminoácidos de camélidos por su homólogo humano tal como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin que ese polipéptido pierda su carácter típico, es decir la humanización no afecta significativamente a la capacidad de unión a antígeno del polipéptido resultante. Tales métodos los conocen los expertos en la técnica.

65 La humanización de anticuerpos de dominio simple de camélidos requiere la introducción y mutagénesis de una cantidad limitada de aminoácidos en una única cadena polipeptídica. Esto es en contraposición a la humanización

de scFv, Fab, (Fab)₂ e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en dos cadenas, la cadena ligera y la pesada y la conservación del ensamblaje de ambas cadenas.

5 Como un ejemplo no limitado, se humanizó el polipéptido de VHH#12B que contiene residuos de tipo humano en FR2. La humanización requirió la mutagénesis de residuos en FR1 en las posiciones 1 y 5 que se introdujeron mediante el cebador usado para la clonación del repertorio y que no se producen de manera natural en la secuencia de llama. La mutagénesis de esos residuos no dio como resultado la pérdida de la actividad de unión y/o inhibición. La humanización también requirió la mutagénesis de residuos en FR3 en las posiciones 74, 76, 83, 84, 93. La mutagénesis de esos residuos no dio como resultado una pérdida drástica de la actividad de unión y/o inhibición (véase la figura 4). La combinación de las mutaciones de FR1 y FR3 no afectó por tanto a la actividad de unión y/o inhibición (figura 5). La humanización también requirió la mutagénesis de residuos en FR4 en la posición 108. La mutagénesis de Q108L dio como resultado un nivel de producción inferior en *Escherichia coli*. La posición 108 está expuesta al disolvente en VHH de camélido, mientras que en anticuerpos humanos esta posición está enterrada en la superficie de contacto VH-VL (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). En VH aislados la posición 108 está expuesta al disolvente. La introducción de una Leu hidrófoba no polar en lugar de Gln no cargada polar puede tener un efecto drástico sobre la estabilidad/plegamiento intrínseco de la molécula.

20 Como un ejemplo no limitado, se humanizó el polipéptido representado en el VHH#3E que contiene residuos distintivos de camélido en las posiciones 37, 44, 45 y 47 con características hidrófilas. El reemplazo de los residuos hidrófilos por residuos hidrófobos humanos en las posiciones 44 y 45 (E44G y R45L), no tuvo ningún efecto sobre la unión y/o inhibición. Sin embargo, se observó pérdida de actividad de unión y/o inhibición cuando se introdujeron F37V y F47W. Los datos de modelado confirmaron que el residuo crítico 37 conservaba la integridad de la conformación del bucle de CDR3 y por tanto la actividad (véase la figura 6) (toda la numeración según Kabat).

25 SEQ ID NO: 3 y 14 presentan una homología de secuencia de aminoácidos de más del 90% con regiones de entramado de VH humanas y por tanto dichos VHH podrían administrarse a pacientes directamente sin esperar una respuesta inmunitaria a partir de los mismos, y sin la carga adicional de la humanización. Por tanto, un aspecto descrito en el presente documento permite la administración directa del polipéptido que comprende SEQ ID NO: 3 y 14, una secuencia homóloga del mismo, o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo a un paciente que necesita el mismo.

30 Una realización de la presente invención es un método para humanizar un VHH que comprende las etapas de reemplazar cualquiera de los siguientes residuos o bien solos o bien en combinación:

- 35 posición de FR1 1, 5, 28 y 30,
- el aminoácido distintivo en las posiciones 44 y 45 en FR2,
- 40 residuos de FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94,
- y posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4;
- numeración según la numeración de Kabat.

45 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa, o un ácido nucleico capaz de codificar para dicho polipéptido para su uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos relacionados con procesos inflamatorios. TNF-alfa está implicado en procesos inflamatorios, y el bloqueo de la acción de TNF-alfa puede tener un efecto antiinflamatorio, lo que es altamente deseable en determinados estados patológicos tales como, por ejemplo, enfermedad de Crohn. Los ejemplos demuestran VHH según la invención que se unen a TNF-alfa y, además, bloquean su unión al receptor de TNF-alfa.

50 Los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención pueden aplicarse a enfermedades autoinmunitarias, tales como enfermedad de Addison (glándula suprarrenal), enfermedades autoinmunitarias del oído (oído), enfermedades autoinmunitarias del ojo (ojo), hepatitis autoinmunitaria (hígado), parotiditis autoinmunitaria (glándulas parótidas), enfermedad de Crohn (intestino), diabetes tipo I (páncreas), epididimitis (epidídimo), glomerulonefritis (riñones), enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Guillain-Barre (células nerviosas), enfermedad de Hashimoto (tiroides), anemia hemolítica (glóbulos rojos), lupus eritematoso sistémico (múltiples tejidos), esterilidad masculina (esperma), esclerosis múltiple (células nerviosas), miastenia grave (unión neuromuscular), pénfigo (piel principalmente), psoriasis (piel), fiebre reumática (corazón y articulaciones), artritis reumatoide (revestimiento articular), sarcoidosis (múltiples tejidos y órganos), esclerodermia (piel y tejidos conjuntivos), síndrome de Sjogren (glándulas exocrinas y otros tejidos), espondiloartropatías (esqueleto axial y otros tejidos), tiroiditis (tiroides), vasculitis (vasos sanguíneos).

65 Entre paréntesis está el tejido afectado por la enfermedad. Esta lista de enfermedades autoinmunitarias pretende ser a modo de ejemplo más que inclusiva.

- Los estados autoinmunitarios para los que los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención pueden aplicarse incluyen, por ejemplo, SIDA, alergia atópica, asma bronquial, eczema, lepra, esquizofrenia, depresión heredada, trasplante de tejidos y órganos, síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, autismo, epilepsia, fenómeno de Arthus, anafilaxia, y alcoholismo y drogadicción. En los estados autoinmunitarios identificados anteriormente, el tejido afectado es la diana primaria, en otros casos es la diana secundaria. Estos estados son parcial o mayoritariamente síndromes autoinmunitarios. Por tanto, al tratarlos, es posible usar los mismos métodos, o aspectos de los mismos métodos que se divulgan en el presente documento, algunas veces en combinación con otros métodos.
- 5 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa según la invención, o un ácido nucleico capaz de codificar para dicho polipéptido para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con procesos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple.
- 10 Pueden usarse polipéptidos y ácidos nucleicos según la presente invención en un método de administración a un sujeto por vías convencionales, tal como por vía intravenosa. Sin embargo, una propiedad especial de los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención es que penetran por barreras tales como membranas tisulares y/o tumores y actúan localmente y actúan localmente sobre los mismos, y son lo suficientemente estables como para soportar entornos extremos tales como en el estómago. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a la administración de polipéptidos anti-TNF-alfa.
- 15 Un sujeto según la invención puede ser cualquier mamífero susceptible de tratamiento mediante polipéptidos terapéuticos.
- 20 La administración oral de polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención da como resultado la provisión de tales moléculas en una forma activa en el colon en sitios locales que están afectados por el trastorno. Estos sitios pueden estar sumamente inflamados y contener células que producen TNF-alfa. Los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención que se unen a TNF-alfa pueden neutralizar el TNF-alfa localmente, evitando la distribución por todo el cuerpo y por tanto limitando efectos secundarios negativos. Microorganismos genéticamente modificados tales como *Micrococcus lactis* son capaces de secretar anticuerpos o porciones funcionales de los mismos. Tales microorganismos modificados pueden usarse como vehículos para la producción y administración locales de anticuerpos o porciones funcionales de los mismos en el intestino. Usando una cepa que produce un polipéptido anti-TNF-alfa, podría tratarse el síndrome inflamatorio del intestino.
- 25 Otro aspecto de la invención implica administrar polipéptidos anti-TNF usando expresión de superficie sobre o secreción a partir de bacterias no invasivas, tales como organismos huésped Gram-positivos como *Lactococcus spec.* usando un vector tal como el descrito en el documento WO00/23471.
- 30 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través del entorno gástrico sin que la sustancia se inactive.
- 35 Ejemplos de trastornos son cualquiera que provoque inflamación, incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple. Tal como conocen los expertos en la técnica, una vez en posesión de dicho constructo de polipéptido, puede aplicarse tecnología de formulación para liberar una cantidad máxima de polipéptido en la ubicación correcta (en el estómago, en el colon, etc.). Este método de administración es importante para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos cuyas dianas se ubican en el sistema digestivo.
- 40 Un aspecto de la invención se usa en un método para tratar, prevenir y/o aliviar, mediante administración por vía oral a un sujeto, los síntomas de un trastorno susceptible de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través del entorno gástrico sin inactivarse, administrando por vía oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento.
- 45 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través del entorno gástrico sin inactivarse.
- 50 Un aspecto de la invención se usa en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al sistema digestivo sin que dicha sustancia se inactive, mediante administración por vía oral a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.
- 55 Un aspecto de la invención se usa en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al torrente sanguíneo de un sujeto sin que la sustancia se inactive, mediante administración por vía oral a un sujeto de un
- 60
- 65

polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas o trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada al tracto vaginal y/o rectal.

Ejemplos de trastornos son cualquiera que provoque inflamación, incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple. En un ejemplo no limitativo, una formulación según la invención comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento, en forma de un gel, una crema, un supositorio, una película, o en forma de una esponja o como un anillo vaginal que libera lentamente el principio activo a lo largo del tiempo (tales formulaciones se describen en los documentos EP 707473, EP 684814, US 5629001).

Un aspecto de la invención se usa en un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada al tracto vaginal y/o rectal, administrando por vía vaginal y/o rectal a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento.

Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada al tracto vaginal y/o rectal.

Un aspecto de la invención se usa en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al tracto vaginal y/o rectal sin que dicha sustancia se inactive, mediante administración al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

Un aspecto de la invención se usa en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al torrente sanguíneo de un sujeto sin que dicha sustancia se inactive, mediante administración al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón.

Ejemplos de trastornos son cualquiera que provoque inflamación, incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple. En un ejemplo no limitativo, una formulación según la invención comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento en forma de una pulverización nasal (por ejemplo, un aerosol) o inhalador. Puesto que el constructo de polipéptido es pequeño, puede alcanzar su diana mucho más eficazmente que las moléculas de IgG terapéuticas.

Un aspecto de la invención es el uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a las vías respiratorias altas y el pulmón, administrando a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento, mediante inhalación a través de la boca o la nariz.

Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón, sin que dicho polipéptido se inactive.

Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa a la nariz, las vías respiratorias altas y el pulmón sin inactivación, mediante administración a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón de un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivación mediante administración a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón de un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal. Debido a su pequeño tamaño, un polipéptido

anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento puede pasar a través de la mucosa intestinal y alcanzar el torrente sanguíneo más eficazmente en sujetos que padecen trastornos que provocan un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn.

5 Un aspecto de la invención es el uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal, administrando por vía oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento.

10 Este procedimiento puede incluso mejorarse mediante un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activos. En este aspecto de la invención, se fusiona VHH a un portador que mejora la transferencia a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo. En un ejemplo no limitativo, este "portador" es un segundo VHH que se fusiona al VHH terapéutico. Tales constructos de fusión se preparan usando métodos conocidos en la técnica. El VHH "portador" se une específicamente a un receptor en la pared intestinal que induce un transporte activo a través de la pared.

15 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa administrada a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

20 Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa a la mucosa intestinal sin que se inactive, mediante administración por vía oral a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa de la invención.

25 Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al torrente sanguíneo de un sujeto sin que se inactive, mediante administración por vía oral a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa de la invención.

30 Este procedimiento puede incluso mejorarse mediante un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activos. En este aspecto de la invención, se fusiona un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describe en el presente documento a un portador que mejora la transferencia a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo. En un ejemplo no limitativo, este "portador" es un VHH que se fusiona a dicho polipéptido. Tales constructos de fusión se preparan usando métodos conocidos en la técnica. El VHH "portador" se une específicamente a un receptor en la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

35 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de los tejidos de debajo de la lengua eficazmente.

40 Los ejemplos de trastornos son cualquiera que provoque inflamación, incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple. Una formulación de dicho constructo de polipéptido tal como se divulga en el presente documento, por ejemplo, un comprimido, pulverización, gota se coloca debajo de la lengua y se absorbe a través de las membranas mucosas a la red capilar de debajo de la lengua.

45 Un aspecto de la invención es el uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de los tejidos de debajo de la lengua eficazmente, administrando por vía sublingual a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

50 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de los tejidos de debajo de la lengua.

55 Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa a los tejidos de debajo de la lengua sin que se inactive, mediante administración por vía sublingual a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

60 Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al torrente sanguíneo de un sujeto sin que se inactive, mediante administración por vía oral a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

65 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente

documento para su uso en un método de tratamiento, prevención y/o alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de la piel eficazmente.

5 Ejemplos de trastornos son cualquiera que provoque inflamación, incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple. Una formulación de dicho constructo de polipéptido, por ejemplo, una crema, película, pulverización, gota, parche, se coloca sobre la piel y pasa a su través.

10 Un aspecto de la invención es el uso en un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de la piel eficazmente, administrando por vía tópica a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

15 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por una sustancia moduladora de TNF-alfa que es capaz de pasar a través de la piel eficazmente.

20 Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa a la piel sin que se inactive, mediante administración por vía tópica a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

25 Un aspecto de la invención es el uso en un método para administrar una sustancia moduladora de TNF-alfa al torrente sanguíneo de un sujeto, mediante administración por vía tópica a un sujeto de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

30 En otra realización de la presente invención, un polipéptido anti-TNF-alfa comprende además un anticuerpo de dominio simple portador (por ejemplo, VHH) que actúa como portador de transporte activo para el transporte de dicho polipéptido anti-TNF-alfa, desde la luz del pulmón hasta la sangre.

35 Un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende además un portador se une específicamente a un receptor presente en la superficie mucosa (células epiteliales bronquiales) dando como resultado el transporte activo del polipéptido desde la luz del pulmón hasta la sangre. El anticuerpo de dominio simple portador puede fusionarse al constructo de polipéptido. Tales constructos de fusión pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. El anticuerpo de dominio simple "portador" se une específicamente a un receptor en la superficie mucosa que induce una transferencia activa a través de la superficie.

40 Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para determinar qué anticuerpos de dominio simple (por ejemplo, VHH) se transportan de manera activa al torrente sanguíneo tras administración nasal. De manera similar, puede administrarse por vía nasal una biblioteca de fagos con VHH inmunizada o no inmunizada, y tras diferentes puntos de tiempo tras la administración, pueden aislarse órganos o sangre para rescatar fagos que se han transportado de manera activa al torrente sanguíneo. Un ejemplo no limitativo de un receptor para transporte activo desde la luz del pulmón hasta el torrente sanguíneo es el receptor de Fc N (FcRn). Un aspecto descrito en el presente documento incluye las moléculas de VHH identificadas mediante el método. Tal VHH puede usarse entonces como VHH portador para la administración de un VHH terapéutico a la diana correspondiente en el torrente sanguíneo tras administración nasal.

50 En un aspecto de la invención, puede usarse un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento, con el propósito de seleccionar agentes que modulan la unión del polipéptido a TNF-alfa. Cuando se identifican en un ensayo que mide la unión o el desplazamiento de dicho polipéptido solo, los agentes tendrán que someterse a pruebas funcionales para determinar si modularían la acción del antígeno *in vivo*. Se facilitan a continuación ejemplos de ensayos de selección principalmente con respecto a SEQ ID NO: 3, aunque puede ser apropiado cualquier polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

55 En un ejemplo de un experimento de desplazamiento, se incuban fagos o células que expresan TNF-alfa o un fragmento del mismo en tampón de unión con, por ejemplo, un polipéptido representado por SEQ ID NO: 3 que se ha marcado, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un modulador candidato. Para validar y calibrar el ensayo, pueden realizarse reacciones de competencia de control usando concentraciones crecientes de dicho polipéptido y que no está marcado. Tras la incubación, se lavan las células exhaustivamente, y se mide el polipéptido marcado, unido según sea apropiado para el marcador dado (por ejemplo, recuento de centelleo, fluorescencia, etc.). Una disminución de al menos el 10% en la cantidad de polipéptido marcado unido en presencia de modulador candidato indica desplazamiento de la unión por el modulador candidato. Se considera que los moduladores candidatos se unen específicamente en este u otros ensayos descritos en el presente documento si desplazan el 50% del polipéptido marcado (dosis de polipéptido de subsaturación) a una concentración de 1 μ M o menos.

Alternativamente, puede monitorizarse la unión o el desplazamiento de la unión mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Pueden usarse ensayos de resonancia de plasmón superficial como método cuantitativo para medir la unión entre dos moléculas mediante el cambio en la masa cerca de un sensor inmovilizado provocado por la unión o la pérdida de unión de, por ejemplo, el polipéptido representado por SEQ ID NO: 3 a partir de la fase acuosa a TNF-alfa inmovilizado en una membrana sobre el sensor. Este cambio en la masa se mide como unidades de resonancia frente al tiempo tras la inyección o eliminación de dicho polipéptido o modulador candidato y se mide usando un biosensor Biacore (Biacore AB). Por ejemplo, puede inmovilizarse TNF-alfa sobre un chip sensor (por ejemplo, chip CM5 de calidad para investigación; Biacore AB) en una membrana lipídica fina según métodos descritos por Salamon *et al.* (Salamon *et al.*, 1996, Biophys J. 71: 283-294; Salamon *et al.*, 2001, Biophys. J. 80: 1557-1567; Salamon *et al.*, 1999, Trends Biochem. Sci. 24: 213-219.). Sarrio *et al.* demostraron que puede usarse SPR para detectar la unión del ligando al receptor de adenosina GPCR A(1) inmovilizado en una capa lipídica sobre el chip (Sarrio *et al.*, 2000, Mol. Cell. Biol. 20: 5164-5174). Un experto en la técnica puede ajustar de manera fina las condiciones para la unión de SEQ ID NO: 3 a TNF-alfa en un ensayo de SPR usando las condiciones notificadas por Sarrio *et al.* como punto de partida.

La SPR puede someter a ensayo moduladores de la unión al menos de dos modos. En primer lugar, un polipéptido representado por SEQ ID NO: 3, por ejemplo, puede unirse previamente a TNF-alfa inmovilizado seguido por inyección de modulador candidato a una concentración que oscila entre 0,1 nM y 1 μ M. El desplazamiento del polipéptido unido puede cuantificarse, permitiendo la detección de la unión del modulador. Alternativamente, el TNF-alfa unido a la membrana puede preincubarse con un modulador candidato y exponerse a, por ejemplo, un polipéptido representado por SEQ ID NO: 3. Una diferencia en la afinidad de unión entre dicho polipéptido y TNF-alfa preincubado con el modulador, en comparación con aquélla entre dicho polipéptido y TNF-alfa en ausencia del modulador demostrará la unión o el desplazamiento de dicho polipéptido en presencia de modulador. En cualquier ensayo, una disminución del 10% o más en la cantidad de dicho polipéptido unido en presencia de modulador candidato, en relación con la cantidad de dicho polipéptido unido en ausencia de modulador candidato indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y dicho polipéptido.

Otro método de detección de la inhibición de la unión de, por ejemplo, un polipéptido representado por SEQ ID NO: 3, a TNF-alfa usa transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un fenómeno de mecánica cuántica que se produce entre un donador de fluorescencia (D) y una aceptor de fluorescencia (A) en proximidad estrecha entre sí (habitualmente < 100 Å de separación) si el espectro de emisión de D se solapa con el espectro de excitación de A. Las moléculas que van a someterse a prueba, por ejemplo, un polipéptido representado por SEQ ID NO: 3 y un TNF-alfa se marcan con una pareja de fluoróforos donador y aceptor complementarios. Mientras están unidos entre sí de manera estrecha por la interacción TNF-alfa:polipéptido, la fluorescencia emitida tras la excitación del fluoróforo donador tendrá una longitud de onda diferente de la emitida en respuesta a la longitud de onda de excitación cuando dicho polipéptido y TNF-alfa no están unidos, lo que proporciona la cuantificación de las moléculas unidas frente a las no unidas mediante la medición de la intensidad de emisión a cada longitud de onda. Se conocen bien en la técnica fluoróforos donadores con los que marcar el TNF-alfa. De particular interés son variantes de la GFP de *A. Victoria* conocida como cian FP (CFP, donador (D)) y amarillo FP (YFP, aceptor (A)). Como ejemplo, la variante de YFP puede prepararse como una proteína de fusión con TNF-alfa. Se conocen en la técnica vectores para la expresión de variantes de GFP como fusiones (Clontech) así como reactivos marcados con fluoróforo (Molecular Probes). La adición de un modulador candidato a la mezcla de polipéptido marcado con fluorescencia e YFP-TNF-alfa dará como resultado una inhibición de la transferencia de energía evidenciada por, por ejemplo, una disminución en la fluorescencia de YFP en relación con una muestra sin el modulador candidato. En un ensayo que usa FRET para la detección de la interacción TNF-alfa:polipéptido, una disminución del 10% o mayor en la intensidad de la emisión fluorescente a la longitud de onda del aceptor en muestras que contienen un modulador candidato, en relación con las muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción TNF-alfa:polipéptido.

Una muestra tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier muestra biológica que contenga TNF-alfa tal como muestras clínicas (por ejemplo, fracciones de células, sangre completa, plasma, suero, tejido, células, etc.), derivadas de muestras clínicas, agrícolas, forenses, de investigación u otras posibles muestras. Las muestras clínicas pueden ser de origen humano o animal. La muestra analizada puede ser de naturaleza tanto sólida como líquida. Es evidente, cuando se usan materiales sólidos, que estos se disuelven en primer lugar en una disolución adecuada.

Una variación de FRET usa la desactivación de la fluorescencia para monitorizar las interacciones moleculares. Una molécula en la pareja de interacción puede marcarse con un fluoróforo, y la otra con una molécula que desactiva la fluorescencia del fluoróforo cuando se lleva a aposición estrecha con la misma. Un cambio en la fluorescencia tras la excitación es indicativo de un cambio en la asociación de las moléculas etiquetadas con la pareja fluoróforo:agente de desactivación. Generalmente, un aumento en la fluorescencia del TNF-alfa marcado es indicativo de que el polipéptido anti-TNF-alfa que lleva el agente de desactivación se ha desplazado. Para ensayos de desactivación, un aumento del 10% o mayor en la intensidad de la emisión fluorescente en muestras que contienen un modulador candidato, en relación con muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa.

Además de los métodos de resonancia de plasmón superficial y FRET, la medición de la polarización de fluorescencia es útil para cuantificar la unión. El valor de polarización de fluorescencia para una molécula etiquetada de manera fluorescente depende del tiempo de correlación rotacional o velocidad de volteo. Complejos, tales como los formados por TNF-alfa que se asocia con un polipéptido anti-TNF-alfa marcado de manera fluorescente, tienen valores de polarización superiores que polipéptido no complejo, marcado. La inclusión de un inhibidor candidato de la interacción TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa da como resultado una disminución en la polarización de fluorescencia, en relación con una mezcla sin el inhibidor candidato, si el inhibidor candidato altera o inhibe la interacción de TNF-alfa con dicho polipéptido. La polarización de fluorescencia es muy adecuada para la identificación de moléculas pequeñas que alteran la formación de complejos de TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa. Una disminución del 10% o más en la polarización de fluorescencia en muestras que contienen un modulador candidato, en relación con la polarización de fluorescencia en una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa.

Otra alternativa para monitorizar las interacciones TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa usa un ensayo de biosensor. Se han descrito en la técnica biosensores ICS (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; Cornell B, Braach-Maksvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek L, y Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" Nature 1997, 387, 580). En esta tecnología, la asociación de TNF-alfa y un polipéptido anti-TNF-alfa se acopla al cierre de canales iónicos facilitados por gramicidina en bicapas de membrana suspendidas y por tanto a un cambio medible en la admitancia (similar a la impedancia) del biosensor. Este enfoque es lineal a lo largo de seis órdenes de magnitud de cambio de admitancia y es adecuado idealmente para la selección a gran escala, de alto rendimiento, de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Un cambio del 10% o mayor (aumento o disminución) en la admitancia en una muestra que contiene un modulador candidato, en relación con la admitancia de una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y dicho polipéptido. Es importante indicar que en ensayos que someten a prueba la interacción de TNF-alfa con un polipéptido anti-TNF-alfa, es posible que no sea necesario que un modulador de la interacción interaccione necesariamente de manera directa con el/los dominio(s) de las proteínas que interaccionan físicamente con dicho polipéptido. También es posible que un modulador interaccione en una ubicación alejada del sitio de interacción y provoque, por ejemplo, un cambio conformacional en el TNF-alfa. No obstante, los moduladores (inhibidores o agonistas) que actúan de esta manera son de interés como agentes para modular la unión de TNF-alfa a su receptor.

Cualquiera de los ensayos de unión descritos puede usarse para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que se une a TNF-alfa, o que afecta a la unión de, por ejemplo, un polipéptido representado por SEQ ID NO: 3 al TNF-alfa. Para hacer esto se hace reaccionar un TNF-alfa con dicho polipéptido en presencia o ausencia de la muestra, y se mide la unión al polipéptido según sea apropiado para el ensayo de unión que está usándose. Una disminución del 10% o más en la unión de dicho polipéptido indica que la muestra contiene un agente que modula la unión de dicho polipéptido al TNF-alfa. Por supuesto, el método generalizado anterior podría aplicarse fácilmente para seleccionar moduladores candidatos que alteran la unión entre cualquier polipéptido anti-TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo, y TNF-alfa o un fragmento del mismo.

Una realización descrita en el presente documento es un agente desconocido identificado mediante el método divulgado en el presente documento.

Una realización descrita en el presente documento es un agente desconocido identificado mediante el método divulgado en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos relacionados con procesos inflamatorios.

Otra realización descrita en el presente documento es un uso de un agente desconocido identificado mediante el método divulgado en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos relacionados con procesos inflamatorios.

Los ejemplos de trastornos incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple.

Una célula que es útil según la invención se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en células bacterianas tales como, por ejemplo, *E. coli*, células de levadura tales como, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, células de insecto o células de mamífero.

Una célula que es útil según la invención puede ser cualquier célula en la que puede introducirse una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende un anti-TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo según la invención, de manera que el polipéptido se exprese a niveles naturales o por encima de los niveles naturales, tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, un polipéptido de la invención que se expresa en una célula presenta una farmacología normal o casi normal, tal como se define en el presente

documento. Lo más preferiblemente, un polipéptido de la invención que se expresa en una célula comprende la secuencia de nucleótidos capaz de codificar para una cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas en la tabla 1 o capaz de codificar para una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos presentada en la tabla 1.

5 Según una realización preferida de la presente invención, se selecciona una célula del grupo que consiste en células COS7, una célula CHO, una célula LM (TK-), una célula NIH-3T3, célula HEK-293, célula K-562 o una célula de astrocitoma 1321N1 pero también otras líneas celulares que pueden transfectarse.

10 En general, “cantidad terapéuticamente eficaz”, “dosis terapéuticamente eficaz” y “cantidad eficaz” significan la cantidad necesaria para lograr el resultado o resultados deseados (modulación de la unión a TNF-alfa; tratamiento o prevención de la inflamación). Un experto habitual en la técnica reconocerá que la potencia y, por tanto, una “cantidad eficaz” pueden variar para los diversos compuestos que modulan la unión a TNF-alfa usados en la invención. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia del compuesto.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “compuesto” se refiere a un polipéptido anti-TNF-alfa de la presente invención, a una composición, o a un ácido nucleico capaz de codificar para dicho polipéptido o dicho polipéptido que comprende uno o más aminoácidos derivatizados.

20 Por “farmacéuticamente aceptable” quiere decirse un material que no es indeseable biológicamente o de otra forma, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el compuesto sin provocar ningún efecto biológico no deseado ni interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

25 Los polipéptidos anti-TNF-alfa divulgados en el presente documento son útiles para tratar o prevenir estados en un sujeto y comprenden administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o composición.

30 Los polipéptidos anti-TNF de la presente invención se usan en un método para tratar o prevenir estados relacionados con artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple en un sujeto y comprenden administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o composición que se une a TNF-alfa.

35 Los polipéptidos anti-TNF-alfa divulgados en el presente documento son útiles para tratar o prevenir estados en un sujeto y comprenden administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de compuestos con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

40 Los polipéptidos anti-TNF-alfa divulgados en el presente documento son útiles para tratar o prevenir estados relacionados con artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple en un sujeto y comprenden administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de compuestos con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

45 La presente invención no se limita a la administración de formulaciones que comprenden un único compuesto de la invención. Está dentro del alcance de la invención proporcionar tratamientos de combinación en los que se administra una formulación que comprende más de un compuesto de la invención a un paciente que necesita de la misma.

Las condiciones mediadas por TNF-alfa incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino y esclerosis múltiple.

50 Un compuesto útil en la presente invención puede formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano o un animal doméstico en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida, es decir, por vía oral o por vía parenteral, por vía intranasal mediante inhalación, vías intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

55 Un compuesto de la presente invención también puede administrarse usando métodos de administración de terapia génica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.399.346. Usando un método de administración de terapia génica, pueden transfectarse adicionalmente células primarias transfectadas con el gen para el compuesto de la presente invención con promotores específicos de tejido para seleccionar como diana órganos, tejido, injertos, tumores o células específicos.

60 Por tanto, el presente compuesto puede 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. Puede encerrarse en cápsulas de gelatina duras o blandas, puede comprimirse para dar comprimidos o puede incorporarse directamente al alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede 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

65

y preparaciones deben contener al menos el 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, por supuesto, puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas, y similares también pueden contener lo siguiente: pueden añadirse aglutinantes tales como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, pueden recubrirse comprimidos, pastillas o cápsulas con gelatina, cera, laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, 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, el compuesto activo puede incorporarse en dispositivos y preparaciones de liberación sostenida.

El compuesto activo también puede administrarse por vía intravenosa o por vía intraperitoneal mediante infusión o inyección. Pueden prepararse disoluciones del compuesto activo o sus sales en agua, opcionalmente mezclado con un tensioactivo no tóxico. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que están adaptados para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones infundibles o inyectables estériles, opcionalmente encapsulados en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento.

El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres glicerílicos no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas secado a vacío y secado por congelación, lo que produce un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional presente en las disoluciones esterilizadas por filtración anteriormente.

Para la administración tópica, el presente compuesto puede aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxialquilos o glicoles o combinaciones de agua-alcohol/glicol, en los que el presente compuesto puede disolverse o dispersarse a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de almohadillas absorbentes, usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o pulverizarse sobre la zona afectada usando pulverizadores de aerosol o de tipo bomba.

También pueden emplearse espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con portadores líquidos para formar pastas, geles, pomadas, jabones extensibles, y similares, para su aplicación directamente a la piel del usuario.

5 Se conocen en la técnica ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden usarse para administrar el compuesto a la piel; por ejemplo, véase Jacquet *et al.* (patente estadounidense n.º 4.608.392), Geria (patente estadounidense n.º 4.992.478), Smith *et al.* (patente estadounidense n.º 4.559.157) y Wortzman (patente estadounidense n.º 4.820.508).

10 Las dosificaciones útiles del compuesto pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en modelos animales. Se conocen en la técnica métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones, y otros animales, a humanos; por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 4.938.949.

15 Generalmente, la concentración del/de los compuesto(s) en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-10% en peso. La concentración en una composición sólida o semisólida 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.

20 La cantidad del compuesto, o una sal o derivado activo del mismo, requerida para su uso en el tratamiento variará no sólo con la sal particular seleccionada 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 al criterio del médico o doctor encargado. Además, la dosificación del compuesto varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto u órgano diana.

25 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 adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones diferenciadas espaciadas de manera flexible; tal como inhalaciones múltiples a partir de un insuflador o mediante la aplicación de una pluralidad de gotas al ojo.

30 Un régimen de administración podría incluir tratamiento a largo plazo, diario. Por "a largo plazo" quiere decirse al menos dos semanas y preferiblemente, varias semanas, meses o años de duración. Un experto habitual en la técnica puede determinar modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación 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 ajustarse por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

35 La invención proporciona un agente que es un modulador de las interacciones TNF-alfa / receptor de TNF-alfa.

El agente candidato puede ser un agente sintético, o una mezcla de agentes, o puede ser un producto natural (por ejemplo, un extracto vegetal o sobrenadante de cultivo). Un agente candidato según la divulgación incluye una molécula pequeña que puede sintetizarse, un extracto natural, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, etc.

40 Pueden seleccionarse agentes moduladores candidatos a partir de bibliotecas grandes de agentes naturales o sintéticos. Se usan actualmente numerosos medios para la síntesis al azar y dirigida de agentes basados en sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos. Están disponibles comercialmente bibliotecas de agentes sintéticos de varias compañías incluyendo Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, RU), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH) y Microsource (New Milford, CT). Una biblioteca química poco común está disponible de Aldrich (Milwaukee, WI). Están disponibles bibliotecas combinatorias y pueden prepararse. Alternativamente, están disponibles bibliotecas de agentes naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales de por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o pueden producirse fácilmente mediante métodos bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, se modifican fácilmente bibliotecas producidas de manera natural y sintética a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

50 Pueden encontrarse agentes útiles dentro de numerosas clases químicas. Agentes útiles pueden ser agentes orgánicos, o agentes orgánicos pequeños. Los agentes orgánicos pequeños tienen un peso molecular de más de 50 aunque menos de aproximadamente 2.500 daltons, preferiblemente menos de aproximadamente 750, más preferiblemente menos de aproximadamente 350 daltons. Las clases a modo de ejemplo incluyen heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides, y similares. Los agentes pueden modificarse para mejorar la eficacia, estabilidad, compatibilidad farmacéutica, y similares. Puede usarse la identificación estructural de un agente para identificar, generar o seleccionar agentes adicionales. Por ejemplo, cuando se identifican agentes peptídicos, pueden modificarse de una variedad de modos para mejorar su estabilidad, tal como usando un aminoácido no natural, tal como un D-aminoácido, particularmente D-alanina, funcionalizando el extremo amino o carboxilo terminal, por ejemplo, para el grupo amino, acilación o alquilación, y para el grupo carboxilo, esterificación o amidación, o similares.

65 Para la selección primaria, una concentración útil de un agente candidato según la invención es de desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100 µM o más (es decir, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M, etc.). La concentración de la selección primaria se usará como límite superior, junto con nueve concentraciones adicionales, en el que las concentraciones adicionales se determinan reduciendo la concentración de la selección primaria a

intervalos semilogarítmicos (por ejemplo, para 9 concentraciones más) para selecciones secundarias o para generar curvas de concentración.

Kit de selección de alto rendimiento

5 Un kit de selección de alto rendimiento según la divulgación comprende todos los accesorios y medios necesarios para realizar la detección de un agente que module las interacciones TNF-alfa/receptor de TNF-alfa mediante la interacción con TNF-alfa en presencia de un polipéptido, preferiblemente a una concentración en el intervalo de 1 μ M a 1 mM.

10 El kit comprende lo siguiente. Células recombinantes de la divulgación, que comprenden y expresan la secuencia de nucleótidos que codifica para TNF-alfa, que se hacen crecer según el kit sobre un soporte sólido, tal como una placa de microtitulación, más preferiblemente una placa de microtitulación de 96 pocillos, según métodos bien conocidos por el experto en la técnica especialmente tal como se describe en el documento WO 00/02045. Alternativamente, se suministra TNF-alfa en una forma purificada para inmovilizarse sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos por el experto en la técnica. Alternativamente, se suministra TNF-alfa en el kit preinmovilizado sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos. El TNF-alfa puede ser TNF-alfa completo o un fragmento del mismo.

20 Se añaden agentes moduladores según la invención a concentraciones de desde aproximadamente 1 μ M hasta 1 mM o más, a pocillos definidos en presencia de una concentración apropiada de polipéptido anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo, estando preferiblemente dicha concentración de dicho polipéptido en el intervalo de 1 μ M a 1 mM. Los kits pueden contener uno o más polipéptidos anti-TNF-alfa (por ejemplo uno o más de un polipéptido representado por cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 15 u otros polipéptidos anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga de los mismos, una porción funcional de los mismos o una porción funcional de una secuencia homóloga de los mismos).

30 Se realizan ensayos de unión según los métodos ya divulgados en el presente documento y se comparan los resultados con el nivel inicial de, por ejemplo, unión de TNF-alfa a un polipéptido anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo, pero en ausencia del agente modulador añadido. Se seleccionan para su análisis adicional pocillos que muestran un aumento o una disminución de al menos 2 veces, preferiblemente 5 veces, más preferiblemente 10 veces y lo más preferiblemente 100 veces en la unión de polipéptido frente a TNF-alfa (por ejemplo) en comparación con el nivel de actividad en ausencia de modulador.

Otros kits útiles según la divulgación

40 La divulgación proporciona kits útiles para seleccionar moduladores de la unión de TNF-alfa/receptor de TNF-alfa, así como kits útiles para el diagnóstico de trastornos caracterizados por disfunción de TNF-alfa. La divulgación también proporciona kits útiles para seleccionar moduladores de trastornos así como kits para su diagnóstico, caracterizándose dichos trastornos por uno o más procesos que implican a TNF-alfa. Los kits útiles según la divulgación pueden incluir un TNF-alfa aislado. Alternativamente, o además, un kit puede comprender células transformadas para expresar TNF-alfa. En una realización adicional, un kit según la divulgación puede comprender un polinucleótido que codifica para TNF-alfa. En todavía una realización adicional, un kit según la divulgación puede comprender los cebadores específicos útiles para la amplificación de TNF-alfa. Los kits útiles según la divulgación pueden comprender un polipéptido frente a TNF-alfa aislado, un homólogo del mismo o una porción funcional del mismo. Un kit según la divulgación puede comprender células transformadas para expresar dicho polipéptido. Los kits pueden contener más de un polipéptido. En una realización adicional, un kit según la divulgación puede comprender un polinucleótido que codifica para TNF-alfa. En todavía una realización adicional, un kit según la divulgación puede comprender los cebadores específicos útiles para la amplificación de una macromolécula tal como, por ejemplo, TNF-alfa. Todos los kits según la divulgación comprenderán los artículos establecidos o combinaciones de artículos y materiales de envasado para los mismos. Los kits incluirán también instrucciones para su uso.

55 Ejemplos

La invención se ilustra mediante el siguiente ejemplo no limitativo.

60 Ejemplo 1: Ejemplo de anticuerpos de camélidos contra el factor de necrosis tumoral-alfa humano

1) Inmunización y construcción de bibliotecas

65 Se inmunizó una llama (*Llama glama*) con TNF-alfa humano. Para la inmunización, se formuló la citocina como una emulsión con un adyuvante apropiado, inocuo para el animal (Specoll, CEDI Diagnostics B.V.). Se administró el cóctel de antígenos mediante inyecciones en dos puntos por vía intramuscular en el cuello. El animal recibió 6

inyecciones de la emulsión, que contenían 100 µg de TNF-alfa a intervalos semanales. A diferentes puntos de tiempo durante la inmunización, se recogieron muestras de sangre de 10 ml del animal y se prepararon sueros. Se verificó la inducción de una respuesta inmunitaria humoral específica de antígeno usando las muestras de suero en un experimento de ELISA con TNF (datos no mostrados). Cinco días tras la última inmunización, se recogió una muestra de sangre de 150 ml. A partir de esta muestra, se fraccionaron anticuerpos convencionales y de cadena pesada (HcAc) (Lauwereys *et al.* 1998) y se usaron en un ELISA, que reveló que los HcAc eran responsables de la respuesta inmunitaria humoral específica de antígeno (datos no mostrados). Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBL), como fuente genética de las inmunoglobulinas de cadena pesada de llama (HcAc), a partir de la muestra de sangre de 150 ml usando un gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) produciendo 5×10^8 PBL. Se espera que la diversidad máxima de anticuerpos sea igual al número de linfocitos B muestreados, que es aproximadamente el 10% del número de PBL (5×10^7). La fracción de anticuerpos de cadena pesada en llama es de hasta el 20% del número de linfocitos B. Por tanto, la diversidad máxima de HcAc en la muestra de sangre de 150 ml se calcula como 10^7 moléculas diferentes. Se aisló el ARN total (alrededor de 400 µg) a partir de estas células usando una extracción con tiocianato de guanidinio ácido (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Se preparó ADNc en 100 µg de ARN total con transcriptasa inversa de VLMM (Gibco BRL) y cebador de oligo-dT o cebadores hexanucleotídicos al azar (Amersham Biosciences) tal como se describió anteriormente (de Haard *et al.*, 1999). Se purificó el ADNc con una extracción con fenol/cloroformo combinada con una precipitación con etanol y se usó posteriormente como molde para amplificar específicamente el repertorio de VHH.

Se amplificó el repertorio de VHH usando ADNc cebado con oligo-dT como molde con un único cebador de entramado 1 (FR1) degenerado ABL013 (5'-GAGGTBCAR**CTGCAGG**ASTCYGG-3'), introduciendo un sitio de restricción *Pst*I (en negrita), en combinación con el cebador de oligo-dT descrito en el documento EP01205100.9. Esta amplificación produce dos fragmentos de 1650 pb y 1300 pb, siendo este último el producto derivado de los genes de HcAc con CH1 delecionado. Se purificó en gel el producto de PCR más pequeño y posteriormente se digirió con *Pst*I y *Bst*EII. El sitio *Bst*EII se encuentra frecuentemente dentro de FR4 de fragmentos de ADN que codifican para VHH derivado de cadena pesada. Alternativamente, se amplificó el repertorio de VHH en un enfoque dependiente de bisagra usando dos cebadores oligonucleotídicos específicos de IgG. En una única reacción de PCR, se combinó un cebador de bisagra corto (5'-AACAGTTAAGCTTCCGCTT**GCGGCCG**CGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3') o largo (5'-AACAGTTAAGCTTCCGCTT**GCGGCCG**CTGGTTGTGGTTTGGTGTCTTGGGTT-3') que se sabe que es específico para HcAc, con el cebador de FR1 ABL013 (véase anteriormente). Se introdujo un sitio de restricción *Pst*I y *Not*I (subrayado y en negrita) dentro de los cebadores FR1 y bisagra respectivamente, para permitir la clonación. Posteriormente, se ligaron los fragmentos de ADN en el vector de fagémido pAX004 digerido con *Pst*I-*Bst*EII o *Pst*I-*Not*I, que es idéntico a pHEN1 (Hoogenboom *et al.*, 1991), pero que codifica para una etiqueta carboxilo terminal (His)₆ y c-myc para la purificación y detección, respectivamente. Se desaló la mezcla de ligamiento en un filtro Microcon (YM-50, Millipore) y se introdujo mediante electroporación en células *E. coli* TG1 para obtener una biblioteca que contenía $1,8 \times 10^7$ clones. Se hicieron crecer las células transformadas durante la noche a 37°C en una única placa de 20x20 cm con LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2%. Se rasparon las colonias de las placas usando medio 2xTY y se almacenaron a -80°C en glicerol al 20%.

Como control de calidad, se verificó el porcentaje de clones que contenían inserto en 24 clones para cada biblioteca mediante PCR usando una combinación de cebadores basados en vector. Este análisis reveló que el 95% de los clones contenían un inserto que codificaba para VHH. Se examinó la variabilidad mediante análisis de la huella genética de *Hinf*I del fragmento de VHH amplificado de estos 24 clones, mostrando de ese modo que todos los clones eran de hecho diferentes (datos no mostrados).

2) Selección de VHH anti-TNF antagonistas

A partir de ambas bibliotecas se preparó un fago. Para rescatar el repertorio de fagos policlonales, se hicieron crecer las bibliotecas hasta la fase logarítmica (DO₆₀₀ = 0,5) a 37°C en 2xTY que contenía ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2% y se superinfectaron posteriormente con el fago auxiliar M13K07 durante 30 minutos a 37°C. Se sedimentaron las células infectadas durante 5 minutos a 4000 rpm y se resuspendieron en 2xTY que contenía ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml. Se propagó el bacteriófago mediante crecimiento durante la noche a 37°C y 250 rpm. Se centrifugaron los cultivos durante la noche durante 15 minutos a 4500 rpm y se precipitó el fago con una quinta parte del volumen de una disolución de [polietilenglicol 6000 al 20%, NaCl 1,5 M] mediante incubación durante 30 minutos sobre hielo. Se sedimentó el fago mediante centrifugación durante 15 minutos a 4000 x g y 4°C. Tras la resuspensión de los fagos en PBS, se sedimentó el residuo celular mediante centrifugación durante 1 minuto a velocidad máxima (15000 x g) en tubos de microcentrífuga. Se transfirió el sobrenadante que contenía las partículas de fago a un nuevo tubo y se precipitó de nuevo el fago tal como se describió anteriormente. Se disolvió el fago en PBS y se separó del residuo celular restante tal como se mencionó anteriormente. Se determinó el título del fago mediante infección de células TG1 logarítmicas seguido por siembra en placa en medio selectivo.

Se seleccionó la biblioteca usando TNF-alfa biotinilado *in vitro*. Se llevó a cabo la biotinilación tal como se describe por Magni *et al* (Anal Biochem 2001, 298, 181-188). Se evaluó la incorporación de biotina en TNF mediante análisis

de SDS-PAGE y detección con conjugado de Extravidin-fosfatasa alcalina (Sigma). Se evaluó la funcionalidad de la proteína modificada para determinar su capacidad para unirse a la fase sólida recubierta con un receptor de p75 recombinante.

5 Se seleccionaron VHH mediante captura de TNF-alfa biotilado (de 10 a 400 ng por pocillo durante 2 horas a temperatura ambiente) sobre placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (recubiertas con 100 μ l de estreptavidina 10 μ g/ml durante 16 horas a +4°C). Se obtuvieron VHH antagonistas mediante elución con un exceso de receptor, o bien el dominio de unión a ligando extracelular o bien con células que expresan el receptor. Tras 2 horas de incubación del fago con citocina capturada, se eliminó por lavado el fago no específico, al mismo tiempo que se eluyó el fago específico que presentaba VHH antagonistas durante 30 minutos con receptor (dominio extracelular de CD120b o p75; 10 μ M) o con células que presentaban receptor ($>10^5$ células KYM por pocillo). Altos enriquecimientos, es decir la razón del número de fagos eluidos con receptor y los eluidos mediante albúmina sérica (50 μ g por pocillo), de más de un factor de 20, sugirieron la selección satisfactoria de clones específicos de TNF-alfa. Alternativamente, en lugar de elución con receptor, se aplicó un procedimiento convencional, en el que un bajo pH provoca la desnaturalización de VHH y/o antígeno (tampón glicina 0,1 M pH 2,5). Se infectaron células *E. coli* que crecían en fase logarítmica con el fago eluido y neutralizado y se sembraron en placa sobre medio selectivo.

Se recogieron clones individuales y se hicieron crecer en una placa de microtitulación para la producción de VHH en sobrenadante de cultivo. El examen mediante ELISA con TNF-alfa capturado sobre placas recubiertas con Extravidin reveló que aproximadamente el 50% de los clones eran positivos. El análisis de la huella genética de *HinfI* mostró que se seleccionaron 13 clones diferentes, que se hicieron crecer y se indujeron a una escala de 50 ml. En la tabla 1, se muestran las secuencias de dichos clones.

Se caracterizaron en más detalle cinco clones, codificados como VHH#1A, #2B, #3E, #3G, #7B y #12B, con diferentes secuencias (figura 1). VHH#3E, #3G y #7B son fragmentos de anticuerpo de dominio simple que portan el residuo hidrófilo típico en la posición 45 (arginina) y la sustitución de fenilalanina por triptófano en la posición 47 en FR2, confiriendo de ese modo las características ventajosas en cuanto a solubilidad. VHH#1A contiene los residuos de FR2 hidrófobos que se encuentran normalmente en anticuerpos de cadena doble de origen humano o de otras especies, pero compensando esta pérdida de hidrofobicidad por el residuo de arginina cargado en la posición 103 que sustituye al residuo de triptófano conservado presente en VH de anticuerpos de cadena doble (documento WO 03/035694). Una nueva clase de anticuerpos de dominio simple de camélidos humanizados descritos en esta invención está representada por VHH#2B y VHH#12B, que contienen los residuos hidrófobos en FR2 en combinación con el residuo hidrófobo triptófano en la posición 103. Se expresaron cantidades más grandes de fragmentos de anticuerpo mediante cultivo a una escala de 50 ml y se purificaron mediante IMAC usando la resina TALON (Clontech). Tras diálisis frente a PBS para eliminar el eluyente imidazol, se determinó la cantidad de VHH mediante DO280; se obtuvieron aproximadamente 300 μ g de VHH de cada clon.

Se usó este material para determinar la sensibilidad de la detección de TNF (biotilado) en ELISA. Para este propósito, se empleó una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (10 μ g/ml) para la captura de TNF biotilado (1 μ g/ml), se diluyó VHH en caseína al 0,2% / PBS y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se detectó VHH unido con AcM anti-MYC 9E10 (0,5 μ g/ml) y conjugado de AP anti-ratón (diluido 1000 veces, Sigma). En la figura 2, se muestran los resultados.

3) Determinación del efecto antagonista en ensayo de citotoxicidad con la línea celular KYM

Se determinó la citostasia/citotoxicidad inducida por TNF-alfa mediante el ensayo de MTT colorimétrico descrito por Vandenebeele y colaboradores (Vandenebeele, P., Declercq, W., Verammen, D., Van de Craen, M., Grooten, J., Loetscher, H., Brockhaus, M., Lesslauer, W., Fiers, W. (1992) Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse cell T hybridoma. *J. Exp. Med.* 176, 1015-1024.). MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un sustrato de color amarillo pálido que se escinde por células vivas para producir un producto de formazán de color azul oscuro. Este proceso requiere mitocondrias activas, e incluso las células recién muertas no escinden cantidades significativas de MTT. Se sembraron células KYM (Sekiguchi M, Shiroko Y, Suzuki T, Imada M, Miyahara M, Fujii G. (1985) Characterization of a human rhabdomyosarcoma cell strain in tissue culture. *Biomed. Pharmacother.* 39, 372-380) en placas de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron en presencia o ausencia de TNF-alfa (0,216 ng/ml o aproximadamente 5 pM de trímero). Además de TNF, se incluyeron cantidades variables de anticuerpo (VHH o Remicade) durante el cultivo. Para el ensayo, se añadió MTT al medio de cultivo a una concentración final de 500 μ g/ml y se incubaron las placas a 37°C para lograr la escisión de MTT por enzimas mitocondriales. Se disolvió el producto de formazán formado, que aparece como cristales negros, difusos en el fondo del pocillo, mediante la adición de isopropanol ácido (HCl 40 nM en isopropanol) o DMSO. Se mide la absorbancia a 570 nm.

El ensayo de MTT (figura 3) muestra que VHH#1A, que tiene una arginina en la posición 103 en combinación con los residuos hidrófobos de tipo humano en FR2, tiene un efecto antagonista moderado (CI50 ~100 nM). VHH#7B con los residuos hidrófilos característicos en FR2 no impide la unión de TNF- α a su ligando a pesar de su detección sensible de la citocina en ELISA (curva no mostrada). En cambio, VHH#3E y #3G con residuos distintivos de FR2 hidrófilos

son VHH antagonistas muy potentes (CI50 de 20 nM). VHH#3E y #3G tienen un alto grado de homología y están relacionados de manera clonal (Harmsen *et al.*, Mol. Immunol. 37, 579-590), pero VHH#3E es más potente, probablemente debido al hecho de que tiene una mayor afinidad que VHH#3G (figura 2). El anticuerpo monoclonal (quimérico) Remicade es muy potente (CI50 de 80 pM), pero su fragmento Fab derivado perdió la mayor parte de esta eficacia (la CI50 es de 3 nM, 30 veces inferior al AcM intacto). Esto muestra claramente el efecto de avididad de la interacción entre el anticuerpo y la citocina: el AcM con dos sitios de unión interacciona más eficazmente con la molécula de TNF trimérica por medio de unión cooperativa. Los fragmentos de VHH son estrictamente monovalentes y, por tanto, se especuló que el aumento de la avididad fusionando genéticamente genes de VHH podría aumentar su eficacia antagonista (véase el ejemplo 4).

Estos experimentos muestran que una nueva clase de VHH de tipo humano tiene características funcionales y de unión auténticas, permitiendo de ese modo su aplicación para propósitos terapéuticos.

Ejemplo 2: Humanización de VHH#12B y VHH#3E mediante mutagénesis dirigida al sitio

1) Homología entre VHH#3E / VHH#12B y DP-47 de región V de cadena pesada de línea germinal humana

La alineación de VHH#12B y una secuencia de línea germinal de VH3 humana (DP-47) reveló un alto grado de homología:

- cambios de 4 AA en FR1 en las posiciones 1, 5, 28 y 30
- cambios de 5 AA en FR3 en las posiciones 74, 76, 83, 84 y 93
- cambio de 1 AA en FR4 en la posición 108

tal como se representa en la siguiente alineación de secuencias:

```

DP-47      EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYY
VHH#12B    QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFefe NHWMY WVRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRY
DP-47      ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
VHH#12B    ADSVKG RFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTK VLPPYSDDSRTNAD WGQGTQVTVSS

```

Un inhibidor específico para la citocina TNF-alfa, con alta homología con el gen de línea germinal humana DP-47 era por tanto un candidato ideal para humanizar adicionalmente y evaluar la influencia de la mutagénesis sobre la capacidad de inhibición en ELISA.

La alineación de VHH#3E y una línea germinal de VH3 humana (DP-47) reveló la presencia de residuos de aminoácido hidrófilos en FR2 de VHH#3E en comparación con residuos hidrófobos en DP-47.

```

DP-47      EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS----- WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYY
VHH#3E     QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS      DHSGYTYTIG      WFRQAPGKEREFVA
RIYWSSGNTYY
DP-47      ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
VHH#3E     ADSVKG RFAISRDIAKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVESYNY WGQGTQVTVSS

```

La evaluación del efecto de sustituir los residuos hidrófilos por hidrófobos tal como están presentes en VH humano es importante, puesto que la mayoría de las secuencias de VHH de camélidos contienen residuos hidrófilos.

2) Mutagénesis de VHH#12B

Se mutó VHH#12B usando un método de mutagénesis dirigida al sitio no basado en PCR tal como se describe por Chen y Ruffner y se comercializa por Stratagene (mutagénesis dirigida al sitio Quickchange). Se usó ADN de plásmido como molde en combinación con 2 cebadores mutagénicos que introducen las(s) mutación/mutaciones deseada(s). Los 2 cebadores son cada uno complementario a hebras opuestas del ADN de plásmido molde. En una reacción de polimerasa usando la *Pfu* ADN polimerasa, se extiende cada hebra a partir de la secuencia de cebador durante un programa de ciclado usando un número limitado de ciclos. Esto da como resultado una mezcla de hebras de tipo natural y mutadas. La digestión con *DpnI* da como resultado la selección de la hebra de ADN sintetizada *in vitro* mutada, puesto que sólo la hebra molde es sensible a la digestión. Se precipitó el ADN y se transformó en *E. coli* y se analizó para detectar la mutación requerida mediante análisis de secuencia. En la tabla 2, se enumeran los

VHH mutantes generados y los cebadores mutagénicos. Se preparó plásmido a partir de clones mutantes y se transformó en células electrocompetentes WK6. Se usó una única colonia para iniciar un cultivo durante la noche en LB que contenía glucosa al 2% y ampicilina 100 µg/ml. Se diluyó este cultivo durante la noche 100 veces en 300 ml de medio TB que contenía ampicilina 100 µg/ml, y se incubó a 37°C hasta DO600 nm = 2, cuando se añadieron IPTG 1 mM y MgSO₄ 5 mM (concentraciones finales) y se incubó el cultivo durante 3 horas más a 37°C.

Se centrifugaron los cultivos durante 20 minutos a 4.500 rpm a 4°C. Se congeló el sedimento durante la noche o durante 1 hora a -20°C. A continuación, se descongeló el sedimento a temperatura ambiente durante 40 minutos, se resuspendió en 20 ml de PBS/EDTA 1 mM/NaCl 1 M y se agitó sobre hielo durante 1 hora. Se aisló la fracción periplásmica mediante centrifugación durante 20 minutos a 4°C a 4.500 rpm. Se cargó el sobrenadante que contenía el VHH sobre TALON (ClonTech) y se purificó hasta la homogeneidad. Se determinó el rendimiento de VHH usando el coeficiente de extinción calculado. Todos los VHH mutantes se expresaban de manera comparable al tipo natural. Se analizaron los mutantes para determinar su capacidad de inhibición en un ensayo de unión a receptor *in vitro*.

Se recubrió una placa de microtitulación durante la noche a 4°C con Enbrel (Wyeth) a 2 µg/ml en PBS. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS que contenía caseína al 1%. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween. Se preincubó TNF-alfa humano biotinilado (80 µg/ml) con una serie de dilución de VHH#12B de tipo natural o mutante durante 1 h a TA y se incubó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente en los pocillos de la placa de microtitulación. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween. Se detectó TNF-α humano unido usando Extravidin-AP (dilución 1/1.000) y fosfato de paranitrofenilo (pNPP). Se midieron las señales tras 30 minutos a 405 nm. En las figuras 4 y 5, se presentan los resultados. La CI50 aumentó 3 veces desde 66 nM (tipo natural) hasta 200 nM (Q1E+Q5L+A74S+Y76N+K83R+P84A mutante). La mutación de la posición T93A dio como resultado pérdida de inhibición (datos no mostrados). Las posiciones que todavía es necesario humanizar son: E28, E30 y Q108. Sin embargo, E28 y E30 son parte de la estructura canónica H1 y, por tanto, parte de la CDR1 según el sistema de numeración de Chothia.

En la tabla 4, se presentan las secuencias de aminoácidos de VHH mutantes SEQ ID NO: 17 a 19.

3) Mutagénesis de VHH#3E

Se mutó VHH#3E usando un método de mutagénesis dirigida al sitio no basado en PCR tal como se describió anteriormente. En la tabla 3, se enumeran los VHH mutantes obtenidos y los cebadores mutagénicos.

Todos los VHH mutantes se expresaban de manera comparable al tipo natural. Se analizaron los VHH mutantes purificados según la unión en ELISA y la capacidad de inhibición en un ensayo de unión a receptor idéntico al método descrito anteriormente.

En la figura 6, se muestran los resultados del ELISA, en la figura 7 los del ensayo de unión a receptor.

En la tabla 4, se presentan las secuencias de aminoácidos de VHH mutantes SEQ ID NO 21 a 24.

Ejemplo 3: Aislamiento de VHH antagonistas contra TNF-alfa de ratón

1) Selección de VHH anti-TNF-alfa de ratón

Con el fin de realizar estudios de eficacia en modelos de ratón de IBD o enfermedad de Crohn, se seleccionaron VHH específicos de TNF de ratón. Por tanto, se inmunizó una llama con TNF-alfa de ratón tal como se describió en el ejemplo 1. Se extrajo ARN de los PBL muestreados 4 y 10 días tras la última inmunización, así como a partir de una biopsia tomada de un ganglio linfático tras el día 4. Se convirtió el ARN total en ADNc o bien cebado al azar o bien cebado con oligo-dT y se usó como molde para la amplificación de los segmentos génicos que codifican para VHH usando cebadores derivados de Ig o una combinación de cebador de oligo-dT y un único cebador de Ig (véase el ejemplo 1). Con los cebadores de Ig, se generó una biblioteca que contenía $8,5 \times 10^7$ clones a partir de los primeros PBL, y una biblioteca con 7×10^6 clones para la segunda muestra de PBL y $5,8 \times 10^8$ clones para el ganglio linfático. Usando la combinación de cebador de oligo-dT y cebador de Ig, se prepararon bibliotecas a partir de la primera muestra de PBL que contenían $1,2 \times 10^8$ clones, a partir de la segunda muestra de PBL una biblioteca de $5,7 \times 10^7$ clones y la biblioteca derivada de ganglio linfático contenía 2×10^8 clones. Se agruparon las bibliotecas dependiendo de la combinación usada de cebadores y se hicieron crecer las dos bibliotecas resultantes para la propagación de fagos tal como se describió anteriormente. Se realizaron selecciones con TNF-alfa de ratón biotinilado capturado sobre estreptavidina recubierto, el eluyó el fago unido mediante competencia con el receptor humano p75, que se sabe que reacciona de manera cruzada con TNF-alfa de ratón. Se seleccionaron dos VHH específicos de TNF-alfa de ratón distintos (VHH#m3F y VHH#m9E) a partir de la biblioteca obtenida mediante amplificación con cebadores derivados de Ig, mientras que se recuperaron dos VHH estrechamente relacionados a partir de la biblioteca construida mediante PCR con cebador de oligo-dT y cebador de Ig (figura 8).

2) Determinación de la eficacia antagonista en ensayo de citotoxicidad con la línea celular L929 (figura 9)

Se aplicó el mismo tipo de ensayo descrito en el ejemplo 1, pero con línea celular murina L929. VHH#m3F y VHH#m4B (figura 9) resultaron ser 10 veces más potentes que los otros dos VHH.

5 Ejemplo 4: Potenciación de la eficacia antagonista aumentando la avidéz usando anticuerpos de camélidos multivalentes

1) Eficacia antagonista de VHH bi, tri y tetravalente contra TNF-alfa humano y de ratón

10 Se diseñó el vector de producción de *E. coli* pAX11 (figura 10), que permite la clonación en dos etapas de VHH bivalente o biespecífico. Se clona en primer lugar el VHH carboxilo-terminal con *PstI* y *BstEII*, mientras que en la segunda etapa se inserta el otro VHH mediante *SfiI* y *NotI*, que no cortan dentro del primer fragmento génico. El procedimiento evita la ejecución de nuevos sitios mediante amplificación y, por tanto, el riesgo de introducir errores por PCR.

15 Con este vector se generó el derivado bivalente VHH#3E anti-TNF-alfa humano antagonista. Se usó el vector de plásmido que codifica para el VHH bivalente para generar un derivado tri y tetramérico, lo que se logró mediante digestión parcial del plásmido con *BstEII*, lo que se produce en ambos segmentos génicos de VHH. Se purificó el vector linealizado a partir del gel, posteriormente se desfosforiló y se usó como aceptor para la clonación del fragmento de *BstEII* de aproximadamente 350 pb que se obtuvo mediante digestión completa del mismo plásmido. El ligamiento del fragmento de *BstEII* solo antes de la adición al vector potencia la inserción de segmentos génicos que codifican para VHH multiméricos. Tras la transformación en *E. coli* TG1, se seleccionaron los clones resultantes mediante PCR con los cebadores M13Rev y M13Fwd; puesto que *BstEII* es un cortador asimétrico (proyección de 5 nt) sólo se obtuvieron insertos orientados correctamente tal como se confirmó digiriendo los plásmidos con *PstI* solo (350 pb) o digiriendo doblemente con *EcoRI* y *HindIII* (1000 pb para bivalente (BIV 3E, SEQ ID NO: 73), 1350 pb para trivalente (TRI 3E, SEQ ID NO: 74) y 1700 pb para tetravalente (TETRA 3E, SEQ ID NO: 75), datos no mostrados). En la tabla 7, se enumeran las secuencias.

20 Se hicieron crecer los clones y se indujeron a una escala de 50 ml, se prepararon fracciones periplásmicas y se usaron para la purificación de IMAC con resina TALON. El análisis de los productos purificados en PAGE teñida con Coomassie reveló buenos niveles de producción (entre 2 y 10 mg por litro de cultivo celular) de VHH multivalente intacto (véase la figura 11). Se determinó el aspecto molecular del VHH purificado por IMAC mediante filtración en gel en una columna Superdex 75HR y tal como se esperaba las moléculas con avidéces superiores eluyeron antes de la columna (véase la figura 12).

25 Se analizó la eficacia antagonista con el ensayo basado en células usando células KYM. Se sembraron las células en placas de microtitulación y se cultivaron en presencia o ausencia de TNF-alfa (1,29 ng/ml o aproximadamente 25 pM de trímero). Los ensayos (figura 13) revelaron que las moléculas monovalentes usadas en este estudio tenían las peores características antagonistas, lo que se refleja por sus valores de CI50: el Fab derivado del anticuerpo quimérico Remicade tiene una CI50 de 2 nM y para VHH#3E es de 12 nM (véase también la figura 3). La avidéz de las moléculas usadas resultó tener una influencia drástica sobre la eficacia antagonista tal como se observó con la molécula de IgG bivalente Remicade, que es 40 veces más eficaz (CI50 de 50 pM) que el Fab. TNF-alfa es una molécula trimérica, que interacciona con un receptor dímérico y, por tanto, puede esperarse que la avidéz de la IgG permita la unión mutua a dos epítomos sobre la citocina y soporte la formación de grandes complejos tal como se ha descrito anteriormente (Santora *et al*, Anal. Biochem. 299, 119-129). Sorprendentemente, el aumento de la avidéz del VHH desde el monómero al dímero tiene un efecto mucho más espectacular que el observado con Remicade, puesto que la CI50 del dímero (30 pM) es 400 veces inferior a la del monómero. Un aumento de la avidéz incluso mayor conduce a un comportamiento antagonista todavía mejor: el VHH trimérico tiene una CI50 de 20 pM y el formato tetravalente de 6 pM. Todos los formatos con avidéz superior del VHH son más eficaces que Remicade, mientras que el formato tetravalente es incluso mejor que Enbrel, que consiste en el dominio extracelular del receptor p75 fusionado al Fc de una IgG y, por tanto, tiene un modo de unión bivalente.

30 Se observó el mismo efecto inesperado de avidéz sobre el comportamiento antagonista con VHH generado contra TNF de ratón (figura 14). Se realizó el mismo tipo de ensayo de citotoxicidad usando MTT como sustrato y TNF-alfa de ratón (65 pg/ml o 1,3 pM), pero con la línea celular murina L929, que expresa el receptor específico de ratón. Se identificaron tres VHH antagonistas diferentes (monovalentes) codificados por 9E y 3F, de los cuales los dos primeros tienen CI50 de 25 nM y el último de 2 nM (véase también el ejemplo 3). La conversión de 3F en el formato bivalente (BIV#m3F, SEQ ID NO: 76) produjo un aumento de 1000 veces en CI50 (2 pM), demostrando de ese modo una vez más que el aumento de avidéz del anticuerpo condujo a una mejora inesperada de las características antagonistas.

2) Comparación con la fusión VHH-Fc

35 Se clonó VHH#3E, dirigido contra TNF humano, por medio de *PstI* y *BstEII* en un vector adaptado derivado de pCDNA3, generando de ese modo una fusión genética con la porción Fc con CH1 delecionado de IgG1 humana. Tras confirmación mediante secuenciación, se transfectó el constructo de plásmido en la línea celular de mieloma

NS0. Se hizo crecer la línea celular obtenida y se secretó la fusión VHH-Fc al sobrenadante de cultivo. Se purificó el producto con una resina de VHH anti-Fc humano y se analizó en un gel teñido con Coomassie (figura 15). En presencia de DTT, la fusión era visible como una proteína de 45 kDa, en ausencia de DTT pudo observarse la molécula con un peso molecular de 90 kDa. Este producto dimérico resulta de la unión de dos cadenas mediante dos puentes disulfuro, que se originan a partir de residuos de cisteína ubicados en la región bisagra.

Se sometió a prueba la fusión de VHH en el bioensayo con la línea celular humana KYM y resultó ser 5 veces menos eficaz que el VHH bivalente a pesar del hecho de que ambas moléculas tienen la misma avidéz y de que se originan ambas a partir de VHH#3E (figura 16). Probablemente el impedimento estérico por la cola de Fc voluminosa podría provocar esta discrepancia.

Ejemplo 5: Cálculo de homologías entre anticuerpos de dominio simple anti-diana de la invención

Se calculó el grado de homología de la secuencia de aminoácidos entre anticuerpos de dominio simple anti-diana de la invención usando el editor de alineación de secuencias Bioedit. Los cálculos indican la proporción de residuos idénticos entre todas las secuencias según se alinean mediante ClustalW. (Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, presentado en junio de 1994). La tabla 8 indica la homología de fracciones entre VHH anti-albúmina sérica de la invención. La tabla 9 indica la homología de fracciones entre VHH anti-TNF-alfa de la invención. La tabla 10 indica el porcentaje de homología entre VHH anti-IFN-gamma de la invención.

Ejemplo 6: Expresión de un fragmento de VHH-CDR3 de VHH#3E

Se amplificó la región CDR3 de VHH#3E usando un cebador sentido ubicado en la región de entramado 4 (directo: CCCCTGGCCCCAGTAGTTATACG) y un cebador antisentido ubicado en la región de entramado 3 (inverso: TGTGCAGCAAGAGACGG).

Con el fin de clonar el fragmento CDR-3 en pAX10, se realizó una segunda ronda de amplificación por PCR con los siguientes cebadores que introducen los sitios de restricción requeridos:

Cebador inverso Sfi1:

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCTGTGCAGCAAGAGACGG

Cebador directo Not1:

GTCCTCGCAACTGCGGCCGCCCCCTGGCCCCAGTAGTTATACG

Se realizaron las reacciones de PCR en un volumen de reacción de 50 ml usando 50 pmol de cada cebador. Las condiciones de reacción para la PCR primaria fueron 11 min a 94°C, seguido por 30/60/120 s a 94/55/72°C durante 30 ciclos, y 5 min a 72°C. Se realizaron todas las reacciones con MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 mM y 1,25 U de AmpliTaq God ADN polimerasa (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica).

Tras escisión con Sfi1 y Not1, se clonó el producto de PCR en pAX10.

Ejemplo 7: Pruebas de estabilidad de fragmentos de anticuerpo específicos para TNF α humano

Las proteínas administradas por vía oral experimentan desnaturalización al pH ácido del estómago y también degradación por pepsina. Se han seleccionado condiciones para estudiar la resistencia del VHH#3E a la pepsina que se supone que imitan el entorno gástrico. Se produjo VHH#3E, un VHH específico para TNF α humano, como proteína recombinante en *E. coli* y se purificó hasta la homogeneidad mediante IMAC y cromatografía de filtración en gel. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de proteína tras la purificación usando el coeficiente de extinción molar calculado a 280 nm. Se prepararon disoluciones diluidas a 100 microgramos/ml en tampón de McIlvaine (J. Biol. Chem. 49, 1921, 183) a pH 2, pH 3 y 4 respectivamente. Se incubaron posteriormente estas disoluciones durante 15 minutos a 37°C, antes de la adición de pepsina de mucosa gástrica porcina a una razón de 1/30 p/p. Sesenta minutos tras añadir la proteasa, se recogió una muestra y se diluyó inmediatamente 100 veces en PBS pH 7,4 que contenía caseína al 0,1% para inactivar la pepsina. Se prepararon siete diluciones de 3 veces adicionales a partir de esta muestra para evaluar la presencia de fragmento de anticuerpo funcional mediante ELISA. Diluciones idénticas preparadas a partir de una alícuota recogida antes de la adición de la proteasa sirvieron como referencia. En el ensayo ELISA, se capturó TNF α biotinilado en pocillos de una placa de microtitulación recubierta con Neutravidin. Para las muestras tanto de referencia como tratadas con pepsina, se prepararon diluciones en serie similares de las muestras y se añadieron 100 microlitros de esas diluciones a los pocillos. Tras incubación durante 1 hora, se lavaron las placas. Para la detección de la unión de VHH al TNF α capturado, se usaron un antisuero de conejo policlonal anti-VHH (R42) y un conjugado de anticuerpo anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina. Tras lavar, se revelaron las placas con fosfato de paranitrofenilo. Los datos representados gráficamente en

la figura 17 muestran curvas similares para todas las muestras expuestas a condiciones digestivas así como para las muestras de referencia. Esto indica que el VHH#3E conserva esencialmente su actividad funcional en todas las condiciones elegidas.

5 Ejemplo 8: Administración oral de un VHH específico anti-TNF α humano en ratones

Se preparó una disolución de anticuerpos que contenía el VHH#3E específico anti-TNF α humano (100 microgramos por mililitro en PBS diluido 100 veces). Se privó en primer lugar a tres ratones de agua potable durante 12 horas y posteriormente se les permitió acceder libremente a la disolución de anticuerpos durante las siguientes dos horas. Después de eso, se sacrificaron los ratones y se diseccionaron sus estómagos. Inmediatamente, se recogió el contenido de los estómagos lavando el estómago con 500 microlitros de PBS que contenía BSA al 1%. Posteriormente se usó este material lavado para preparar diluciones de tres veces en serie, comenzando a una dilución 1/5 a partir del material no diluido. Se transfirieron cien microlitros de estas muestras a pocillos individuales de una placa de microtitulación recubierta con TNF α humano. Tras incubación durante 1 hora y tras lavado exhaustivo, se evaluó la presencia de material inmunorreactivo con un antisuero de conejo policlonal anti-VHH (R42) seguido por incubación con un conjugado de anticuerpo anti-conejo-fosfatasa alcalina. Se reveló el ELISA con acetato de paranitrofenilo. Las señales de ELISA obtenidas tras 10 minutos demostraron claramente la presencia de VHH#3E funcional en los lavados gástricos de estos ratones. Comparando con la curva patrón, se determinó que la concentración del fragmento de anticuerpo funcional en el fluido de lavado gástrico era de 1,5, 12,6 y 8,6 microgramos/ml para los tres ratones sometidos a prueba.

Ejemplo 9: Eficacia en un modelo animal para IBD

1) Modelo animal de colitis crónica

Se evaluó la eficacia de constructos de VHH bivalentes aplicados por diversas vías de administración en un modelo inducido por DSS (sulfato sódico de dextrano) de colitis crónica en ratones BALB/c. Este modelo lo describieron originariamente Okayasu *et al.* [Okayasu *et al.* Gastroenterology 1990; 98: 694-702] y lo modificaron Kojouharoff *et al.* [G. Kojouharoff *et al.* Clin. Exp. Immunol. 1997; 107: 353-8]. Se obtuvieron los animales de Charles River Laboratories, Alemania, a una edad de 11 semanas y se mantuvieron en la instalación para animales hasta que alcanzaron un peso corporal de entre 21 y 22 g. Se indujo colitis crónica en los animales mediante cuatro ciclos de tratamiento con DSS. Cada ciclo consistía en un intervalo de tratamiento con DSS (7 días) en el que se proporcionó DSS con el agua potable a una concentración del 5% (p/v) y un intervalo de recuperación (12 días) sin DSS presente en el agua potable. El último periodo de recuperación se prolongó desde 12 hasta 21 días para proporcionar un estado de inflamación que representaba una inflamación crónica más que aguda en el momento del tratamiento. De forma posterior al último intervalo de recuperación, se asignaron aleatoriamente los ratones a grupos de 8 ratones y se inició el tratamiento con los constructos de VHH. El intervalo de tratamiento fue de 2 semanas. Una semana tras el final del intervalo de tratamiento se sacrificaron los animales, se diseccionó el intestino y se examinó histológicamente. En la figura 18, se muestra esquemáticamente el entorno experimental.

2) Programa de tratamiento con VHH

Durante el periodo de tratamiento con VHH, se trataron diariamente los ratones (8 animales por grupo) durante 14 días consecutivos con VHH#3F bivalente (VHH#m3F-VHH#m3F; SEQ ID No. 76) mediante aplicación intragástrica o intravenosa de 100 μ g de VHH 3F bivalente. Se trató por vía rectal un grupo adicional de animales con el VHH#3F bivalente cada dos días durante un periodo de 14 días. En todos los grupos de tratamiento, se aplicó una dosis de 100 μ g del VHH#3F bivalente a una concentración de 1 mg/ml en una disolución tamponada. Los grupos control negativo recibieron 100 μ l de PBS en condiciones por lo demás idénticas. En la tabla 11, se muestra el programa de tratamiento.

3) Resultados

Tras sacrificarse los ratones, se determinó el peso corporal y se diseccionó el colon. Se determinó la longitud del colon diseccionado y se evaluó la histología del colon mediante tinción con hematoxilina-eosina (HE) (condiciones convencionales). En comparación con los controles negativos (tratamiento con PBS), los grupos tratados con el nanocuerpo bivalente 3F mostraron una longitud de colon extendida así como una puntuación histológica mejorada [G. Kojouharoff *et al.* Clin. Exp. Immunol. 1997; 107: 353-8] demostrando de ese modo la eficacia del tratamiento.

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
VHH#1A	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDFSVSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYVDSVKGRFTTISRDNKNTLYLQMDSLIPEDTALVYCAR SPSGSFRGQGTQVTVSS
VHH#7B	2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRVNAMGWYRQVPGNQREFVA IITSGDNLNYADAVKGRFTTISTDNLVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNAI LQTSRWSIPSNYWGQGTQVTVSS

ES 2 655 912 T3

VHH#2B	3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYWMYVWRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTK VPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
VHH#3E	4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIWFRQAPGKE REFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNLEPEDTAV YYCAARDGIPTSRSVESYNYWGOGTQVTVSS
VHH#3G	5	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGKERE FVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYY CAARDGIPTSRVGSYNYWGOGTQVTVSS
VHH#10A	6	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRVNAMGWYRQVPGNQREFVA IITSSDTNDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYC NAVLQTSRWSIPSNYWGOGTQVTVSS
VHH#2G	7	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTISVYAMGWFRQAPGKERE SISGSGAITPYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCAA SRYARYRDVHAYDYWGQGTQVTVSS
VHH#1F	8	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASRTFSTRYVVGWFRQAPGKERE TISWNGEHTYYADSVKGRYTIISRDNAKNTVYLQMGSLKPEDTAVYYCAA RSFWGYNVEQRDFGWSWGOGTQVTVSS
VHH#9C	9	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRVNAMGWYRQVPGNQREFVA IITNDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNTVL QTSRWNIPNTNYWGOGTQVTVSS
VHH#11E	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRVNAMGWYRQVPGNQREFVA IISGDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLESEDTAVYYCNAVL QTSRWSIPSNYWGOGTQVTVSS
VHH#10C	11	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLACVASGSI FSDVMGWYRQAPGQORELVA TITNSWTNTNYADSVKGRFTISRDNAKNVVYLQMNLSKLEDTAVYYCNAR RWYQPEAWGOGTQVTVSS
VHH#4B	12	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHWMYVWRQAPGKGLEWVS TINTNGLITDYIHSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSKSEDTAVYYCAL NQAGLSRGQGTQVTVSS
VHH#10D	13	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRTFSGYAMGWFRQAPGKERE VVSQTGTIAYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSKPEDTGLYYCAV GPSSSRWYYRGASLVDYWGKGLTVTVSS
VHH#12B	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFENHWMYVWRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTK VLPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
VHH#m9A	79	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGLSSYITGWFRQAPGKERE AVSWSSSTIVYADSVKGRFTISRDNHQNNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAA RPYQKYNWASASYNVWGOGTQVTVSS
VHH#m9E	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGLSSYITGWFRQAPGKERE AVSWSSSTIVYADSVKGRFTISRDNHQNNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAA RPYQKYNWASASYNVWGOGTQVTVSS
VHH#m3F	16	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSSIMAWFRQAPGKERE AVSWSSSTIVYADSVKGRFTISRDNHQNNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAA RPYQKYNWASASYNVWGOGTQVTVSS
VHH#m4B	80	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCGVSGLSFGYTMGWFRQAPGKERE AIGWNSGTTTEYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA SPKYMTAYERSYDFWGOGTQVTVSS
VHH#8-29	81	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWYVWRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNAKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCAR DPSGKLRGPGTQVTVSS
VHH#8-41	82	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWYVWRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNAKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCAR DPSGKLRGPGTQVTVSS
VHH#8-42	83	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWYVWRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNAKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCAR DPSGKLRGPGTQVTVSS

VHH#8-44	84	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHWMYWVRQAPGKGLEWVS TINTNGLITNYIHSVKGFRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCAL NQAGLSRGQGTQVTVSS
----------	----	--

Tabla 1: Lista de secuencias de aminoácidos de los péptidos dirigidos contra TNF-alfa.

Mutación	Molde	Secuencia de cebador
A74S+Y76N+ K83R+P84A	Tipo natural	5' -AGA GAC AAC TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG-3' Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
Q1E+Q5L+A7 4S+Y76N+K8 3R+P84A	A74S+Y76N+ K83R+P84A	5' -C ATG GCT GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3' Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
Q1E+Q5L+A7 4S+Y76N+K8 3R+P84A+T9 3A	Q1E+Q5L+A7 4S+Y76N+K8 3R+P84A	5' -G GAC ACG GCC GTC TAT TAC TGT GCA AAA GTA CTT C-3' Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Leu

5 Tabla 2: Lista de reacciones de mutagénesis, cebadores mutagénicos y moldes usados para la mutagénesis de VHH#12B

Mutación	Molde	Secuencia de cebador
F37V	Tipo natural	5' -ACC TAT ACC ATT GGC TGG GTC CGC CAG GCT-3' Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala
E44G	Tipo natural	5' -CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CGT GAG TTT-3' Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
R45L	Tipo natural	5' -A GGG AAG GAG CTT GAG TTT GTA GCG CGT AT-3' Gly Lys Glu Leu Glu Phe Val Ala Arg
F47W	Tipo natural	5' -A GGG AAG GAG CGT GAG TGG GTA GCG CGT AT-3' Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ala Arg

10 Tabla 3: Lista de reacciones de mutagénesis, cebadores mutagénicos y moldes usados para la mutagénesis de VHH#3E

SEQ ID	Nombre	Secuencia
17	VHH#12B A74S+Y76N +K83R+P84 A	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVY YCTKVLPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
18	VHH#12B Q1E+Q5L+A 74S+Y76N+ K8K83R+P84A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVY YCTKVLPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
19	VHH#12B Q1E+Q5L+A 74S+Y76N+ K83R+P84A +T93A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVY YCAKVLPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
20	VHH#12B Tipo natural	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKSEDTAVY YCTKVLPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS

21	VHH#3E F37V	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWVRQAPG KREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
22	VHH#3E E44G	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWVRQAPG KREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWG QGTQVTVSS
23	VHH#3E R45L	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWVRQAPG KELEFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
24	VHH#3E F47W	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWVRQAPG KEREWVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
25	VHH#3E tipo natural	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWVRQAPG KREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS

Tabla 4: Visión general de VHH anti-TNF-alfa de tipo natural

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		Anti-albúmina sérica de ratón
MSA21	26	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGV EWWSGISSLDSTLYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSS
MSA24	27	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSNTIYADSVKDRFTISR DNAKSTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSS
MSA210	28	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLT CTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLE WVSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISR DNAKMLFLQMNLSLKPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQGTQVTVSS
MSA212	29	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLT CTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKLE WVSAISADGSDKRYADSVKGRFTISR DNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYC VIGRGSPPASQGTQVTVSS
MSAc16	85	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLS CVVSGTTFSSAAMGWFRQAPGKER EFVGAIKWSGTSTYYTDSVKGRFTISR DNVKNVYLYLQMNLSLKPEDTGVYTC AADRDYRDRMGPMITTDLFRFWGQGTQVTVSS
MSAc12	86	QVKLEESGGGLVQDGGSLRLS CAASGRTFSSFAMGWFRQAPGRERE FVASIGSSGITTNVYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLYLQMNLSLKPEDTGLCYC AVNRYGIPYRSGTQYQNWGQGTQVTVSS
MSAc10	87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGLTFNDYAMGWFRQAPGKERD MVAATISIGGRTYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLYLQMNLSLKPEDTAIYYC V AHRQTVVRGYPYLLWGQGTQVTVSS
MSAc14	88	QVQLVESGGKLVQAGGSLRLS CAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKER EFVAGSGRSNSYNYSDSVKGRFTISR DNAKNTVYLYLQMNLSLKPEDTAVYYC AASTNLWPRDRNLAYWGQGTQVTVSS
MSAc16	89	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLS CAASGRSLGIYRMGWFRQVPGKER EFVAAISWGGTTRYLDSVKGRFTISR DSTKNVYLYLQMNLSLKPEDTAVYYC AVDSSGRLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAc19	90	QVQLVEFGGGLVQAGDSLRLS CAASGRSLGIYKMAWFRQVPGKER EFVAAISWGGTTRYIDSVKGRFTISR DNTKNMVYLYLQMNLSLKPDDTAVYYC AVDSSGRLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAc15	91	EVQLVESGGGLVQAGGSLSL SCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKER EFLAGVTWSGSSTFYGDSVKGRFTAS RDSAKNTVTLEMNSLNPEDTAVYYC AAAYGGGLYRDPRSYDYWGRGTQVTVSS

ES 2 655 912 T3

MScl11	92	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGFTLD AWP IAWFRQAPGKERE G V SCIRDGTTYADSVKGRFTI SSDNANNTVYLQ TNSLKPEDTAVYYCAA ESGPATGSSHTFGLYWNLRDDYDNWGOGTQVTVSS
MSAcl15	93	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGFTFDHYTIGWFRQVPGKERE G V SCISSSDGSTYYADSVKGRFTI SSDNAKNTVY LQMNTLEPDDTAVYYC AAGLLLRVEELOASDYDYWGOGIQVTVSS
MSAcl8	94	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CTASGFTLDYYAIGWFRQAPGKERE G V ACTISMSDGSTYYGDSVKGRFTI SRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAVYYC ATADRHYSASHHPFADF AFNSWGOGTQVTVSS
MSAcl7	95	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAAYGLTFWRAAMAWFRAPGKERE L V VARNWGDGSTRYADSVKGRFTI SRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYC AAVRTYGSATYDIWGOGTQVTVSS
MSAcl20	96	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLS CIFSGRTFANYAMGWFRQAPGKERE F V AAINRNGGTTNYADALKGRFTI SRDN TKNTAFLQMNSLKPDDTAVYYC AAREWPFSTIPSGWRWYWGOGTQVTVSS
MSAcl4	97	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLS CAASGPTASSHAIGWFRQAPGKERE F V VGINRGGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKN TVYLQMNRLKPEDSAIYIC AARPEYSFTAMSKGDMDYWGKGLTVTVSS
		Anti-albúmina sérica de ratón/anti-TNF-alfa
MSA21/ VHH#3E	30	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWV SGISSLG DSTLYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQ PAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYADSVKGRF AISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGOGTQVT VSS
MSA24/ VHH#3E	31	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFRNF GMSWVRQAPGKEPEWV SSISGSGSNTIYADSVKDRFTI SRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSSEPKTPKPQ PAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYADSVKGRF AISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGOGTQVT VSS
MSA210/ VHH#3E	32	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLT CTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTI SRDNAKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGS PSSQGTQVTVSSEPKTPKPQ PAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYADSVKGRFA ISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGOGTQVTV SS
MSA212/ VHH#3E	33	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLT CTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISADGSDKRYADSVKGRFTI SRDNGKMLFLDMNSLKPEDTAVYYC VIGRGS PASQGTQVTVSSEPKTPKPQ PAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYADSVKGRFA ISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGOGTQVTV SS
MSA21/ MSA21/ VHH#3E	34	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWV SGISSLG DSTLYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQ PAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS LRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISSLG DSTLYADSVK GRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTV SSEPKTPKPQ PAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSG YTYTIGWFRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYADSVKGRFAISRDIAKN TVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGOGTQVTVSS
MSA210/ VHH#1A	35	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLT CTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTI SRDNAKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGS PPSQGTQVTVSSEPKTPKPQ PAAAQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCATSGFD FSVSWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYVDSVKG RFTI SRDNAKNTLYLQMDSLIPEDTALYYCARSPSGSFRGOGTQVTVS S

MSA210/ VHH#7B	36	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAAKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSI FRVNAMGWYRQVPGNQREFVAITTSGDNLNYADAVKGR FTI STDNVKKT VYLQMNVLKPEDTAVYYCNAILQTSRWSI PSNYWGQG TQVTVSS
MSA210/ VHH#2B	37	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAAKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCATSGFTFSDYWMYWRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGR FTISRDNAAKTYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTKVPPYSDDSR TNADWG OGTQVTVSS
MSA210/ VHH#3E	38	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAAKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRFTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYA DSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSR SVE SYNYWGQGTQVTVSS
MSA210/ VHH#3G	39	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAAKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQDSGGGLVQAGGSL RLSCAVSGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGKEREFVARIYWSSANTYYADS VKGRFTISRDNAAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSR TVGSY NYWGQGTQVTVSS
MSA21/ VHH#12B	40	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWV SGISSLDSTLYADSVKGRFTISRDNAAKNTLYLQMNLSKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGS LRLSCAASGF EFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVK GRFTISRDNAAKTYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSR TNADW GQGTQVTVSS
MSA24/ VHH#12B	41	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCEASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWV SSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNAAKSTLYLQMNLSKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGS LRLSCAASGF EFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVK GRFTISRDNAAKTYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSR TNADW GQGTQVTVSS
MSA210/ VHH#12B	42	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAAKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGF EFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGR FTISRDNAAKTYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSR TNADWG OGTQVTVSS
MSA212/ VHH#12B	43	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISADGSDKRYADSVKGRFTISRDNAAKMLFLDMNSLKPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGF EFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGR FTISRDNAAKTYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSR TNADWG OGTQVTVSS

Tabla 5: VHH anti-albúmina sérica de ratón, y anti-albúmina sérica de ratón + anti-TNF-alfa

Familia de seq.	Nombre	Seq. Id	Secuencia
1	MP3D2SRA	44	QVQLQDSGGGTVQAGGSLRLSCEASGRTFSDYAVGWFRQA PGKEREFVARI LWTGASRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVY LQMNLSKPEDTAIYYCAALPSNIITTDYLRVYYWGQGTQV TVSS
1	MP3A3SR	45	QVQLQDSGGGTVQAGGSLRLSCEASGRTFSDYAVGWFRQA PGKEREFVARI KWSGGSRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVY LQMNLSKPEDTAIYYCAALPSNIITTDYLRVYYWGQGTQV TVSS

ES 2 655 912 T3

2	MP3C5SR	46	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGVSFVSRTPMGWY RQAPGKQRELVAGILTSGATSYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNLSLPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGOGTQVTVSS
2	MP3C1SR	47	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGVSFVSRTPMGWY RQAPGKQRELVAGILSSGATVYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNLSLPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGOGTQVTVSS
2	MP3G8SR	48	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGVSFVSRTPMGWY RQAPGKQRELVAGILSSGATAYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNLSLPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGOGTQVTVSS
3	MP3D2BR	49	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAAASRGIFRFNAGGWYRQA PGKQRELVAFIGVDNITRYIDSVKGRFTISRDNAKTTVYL QMNSLQPEDTAVYYCNKVPYIDWGOGTQVTVSS
4	MP3H6SRA	50	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAASGRFTFSTYINMGWFRQA PGKEREFVAGISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVY LQMNLSLKPEDTGVIYCASKGRPYGVPSPRQGDYDYWGQGT QVTVSS
4	MP3B4SRA	51	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAASGRFTFSTYINMGWFRQA PGKEREFVAGISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVY LQMNLSLKPEDTGVIYCASKGRPYGVPSPRQGDYDYWGQGT QVTVSS
4	MP4E4BR	52	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAASGRFTFSTYINMGWFRQA PGKEREFVAAISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVY LQMNLSLKPEDTGVIYCASKGRPYGVPSPRQGEYDYWGQGT QVTVSS
4	MP4H8SR	53	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAASGRFTFNTYINMGWFRQA PGKERDFVAAISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVY LQMNLSLKPEDTGVIYCASKGRPYGVPSPRQGDYDYWGQGT QVTVSS
5	MP2F6SR	54	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAAASGRFTFNINMGWFRQA PGKEREFVAAISWNGGSTYYDDSVKGRFTISRDNANNLVY LQMNLSLNFEDTAVYYCACAANPYGIPQYRENRYDFWGQGT QVTVSS
5	MP3D1BR	55	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAASGRFTFDNINMGWFRQA PGKEREFVAAISWNGGSTYYDDSVKGRFTISRDNFQKLVY LQMNLSLKLDTAVYYCACAANPYGIPQYRENRYDFWGQGT QVTVSS
6	MP2B5BR	56	QVQLVESGGRLVQAGGSLRLSCLASGRFTISDYAAGWFRQA PGKEREFVAVTWGFGSTSYADSVKGRFTISRDKAKDTVY LQMNLTLEPDDTAVYYCASSPRYCAGYRCYVTAASEFDSWGQ GTQVTVSS
6	MP2C1BR	57	QVKLEESGGRLVQAGGSLRLSCLASGRFTISDYAAGWFRQA PGKEREFVAVSWGFGSTYYADSVKGRFTISRDTAKDTVY LQMNLTLEPDDTAVYYCASSPRYCAGYRCYATASEFDSWGQ GTQVTVSS
6	MP4A12SR	58	QVQLQESGGRLVQAGGSLRLSCLASGRFTISDYAAGWFRQA PGKEREFVAVTWGFGSTYYADSVKGRFTISRDKAKDTVY LQMNLTLEPDDTAVYYCASSPRYCAGYRCYVTAASEFDSWGP GTQVTVSS
7	MP3F4SRA	59	QVQLQDSGGGLVQAGDSLRLSCAAASGRSFSSYGMWFRQA PGKEHEFVAGIWRSGVSLYYTDSVKGRFTISRDDAKMTVS LQMNLSLKPEDTAVYYCAAETFPWTSRGRFADYDYRGQGT QVTVSS
7	MP3D3BR	60	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRSFSSYGMWFRQA PGKDHEFVAGIWRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVS LQMNGLKPEDTAVYYCAAETFPWNRGTFADYDYRGQGT QVTVSS

7	MP3E5BR	61	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAASGRSFSSYGMGWFQRQA PGKEHEFVAGIWRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVVS LQMNGLKPEDTAVYYCAA EATFPTWNRG SFADYDYRGQGT QVTVSS
7	MP3C7SRA	62	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAASGRSFSSYGMGWFQRQA PGKEHEFVAGIWRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVVS LQMNSLKPEDTAVYYCAA EATFPTWNRGRFADYDYSGQGT QVTVSS
8	MP2F1BR	63	AVQLVBSGGGLVQTGDSLRLS CVASGGTFSTRYAMGWFQRQA PGKEREFVARIGYSGRSISYATSVEGRFAISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYQADYWGQGTQVTVSS
8	MP2C5BR	64	QVQLVBSGGGLVQTGDSLRLS CVASGGTFSTRYAMGWFQRQA PGKERDFVARIGYSGQSI SYATSVEGRFAISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYKPNYWGQGTQVTVSS
9	MP2C10BR	65	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLS CAASGLTYTVGWFRQAPGK EREFVAAISWSSGGSALYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM GSLPEPDTAVYSCAAPGTRYVYGSNQNQVNYNWGQGTQVTVS S
9	MP2G5SR	66	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLS CAASGLTYTVGWFRQAPGK EREFVAAIDWSSGGSALYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM GSLPEPDTAVYWCAAPGTRYHGRNQVNYNWGQGTQVTVS S
10	MP3B1SRA	67	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTSSNYAMSWVRQA PGKGLEWVSSINSRTGSI TYADSVKGRFTITLDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVYYCASRVDDRVS RGQGTQVTVSS
11	MP2F10SR	68	QVQLVBSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTISSFRMGWFRRRA PGEEREFVAFVRSNGTSTYYADSVGRFTITRDNAKNTVY LRMDSLKPEDTAVYYCAAATRDYGGSFYWGQGTQVTVSS
11	MP3A7SRA	69	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFSSFRMGWFRRRA PGEEREFVAFVRSNGTSTYYADSVGRFTITRDNAKNTVY LRMDSLKPEDTAVYYCAAATRDYGGSFYWGQGTQVIVSS
12	MP4C10SR	70	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNYAMSWVRQP PGKGI EWVSSINNRNDHI TYADSVKGRFTIARDNANNILY LQMNSLKPEDTAVYYCASRVDDRVS RGQGTQVTVSS
13	MP4D5BR	71	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSSYGMWFRQA PGKERELVVA INRSGGATSYATSVRGRFTISRDNAKNTMY LQMNSLNPEDTAVYYCAARDPRTYSSYFEYTYWGQGTQV TVSS
14	MP3F1SRA	72	QVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCV ASGRTISDYAVGWFRQA PGKEREFVASISWGGGFTAFADSMKGRFTISRDNAKNTVY LQHTLEPDDT SVYYCASSRRYCTGYRCYATASEFDSWGQ GTQVTVSS

Tabla 6: Lista de secuencias de aminoácidos de VHH dirigidos contra IFN-gamma humano.

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		Con secuencia de ligador (subrayada)
BIV 3E	73	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFSSIMAWFRQAPGKEREFVAVSWSG GTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASAS YNVWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQPAQAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTF SSIIMAWFRQAPGKEREFVAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
TRI 3E	74	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVAR IYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTS RSVESYNYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CA SGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRVESYNYWGQGTQVTVSSSEPKTP KPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGK EREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA RDGIPTSRVESYNYWGQGTQVTVSS

TETRA 3E	75	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVAR IYSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTS RSVESYNYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS SGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSEPKTP KPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGK EREFVARIYSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCA ARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGS LRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYSSGNTYYADSVKGR FAISRDI AKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTV SS
BIV#m 3F	76	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVAVSWSG GTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNLSKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASAS YNVWGQGTQVTVSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SSIIMAWFRQAPGKEREFVAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
		Sin secuencia de ligador
BIV#3 Edir	77	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVAVSWSG GTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNLSKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASAS YNVWGQGTQVTVSSQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAP GKEREFVAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNLSKPEDTAVYYC AARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
BIV#12 Bdir	78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEPENHWMYVWRQAPGKLEWVSTVNTNG LITRYADSVKGRFTISRDN AKYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTN ADWGQGTQVTVSSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEPENHWMYVWRQAPG KLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDN AKYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCT KVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS

Tabla 7: Secuencias de VHH bivalente (BIV 3E, BIV#m3F), trivalente (TRI3E) o tetravalente (TETRA 3E) dirigido contra TNF-alfa.

SEQ	MSA21	MSA24	MSA210	MSA212
MSA21	1,000	0,834	0,800	0,782
MSA24	---	1,000	0,782	0,791
MSA210	---	---	1,000	0,903
MSA212	---	---	---	1,000

5

Tabla 8: Homologías fraccionales entre las secuencias de aminoácidos de VHH anti-albúmina sérica de ratón.

SEQ	VHH#1A	VHH#7B	VHH#2B	VHH#3E	VHH#3G	VHH#10A	VHH#2G	VHH#1F	VHH#9C	VHH#11E	VHH#10C	VHH#4B	VHH#10D	VHH#12B	VHH#9E	VHH#3F
VHH#1A	1,000	0,601	0,764	0,596	0,622	0,600	0,682	0,629	0,609	0,601	0,614	0,818	0,642	0,747	0,596	0,604
VHH#7B	--	1,000	0,604	0,635	0,645	0,943	0,653	0,616	0,933	0,933	0,719	0,593	0,614	0,620	0,616	0,624
VHH#2B	--	--	1,000	0,620	0,645	0,611	0,682	0,661	0,629	0,620	0,637	0,796	0,634	0,951	0,620	0,645
VHH#3E	--	--	--	1,000	0,875	0,641	0,713	0,689	0,620	0,643	0,612	0,604	0,648	0,596	0,674	0,682
VHH#3G	--	--	--	--	1,000	0,651	0,779	0,740	0,637	0,637	0,653	0,645	0,689	0,622	0,708	0,716
VHH#10A	--	--	--	--	--	1,000	0,658	0,614	0,935	0,935	0,725	0,592	0,612	0,626	0,622	0,637
VHH#2G	--	--	--	--	--	--	1,000	0,741	0,653	0,669	0,685	0,666	0,746	0,650	0,701	0,717
VHH#1F	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,616	0,616	0,664	0,661	0,714	0,645	0,709	0,717
VHH#9C	--	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,941	0,743	0,601	0,622	0,645	0,600	0,616
VHH#11E	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,719	0,601	0,622	0,637	0,608	0,624
VHH#10C	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,650	0,606	0,637	0,600	0,632
VHH#4B	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,611	0,796	0,588	0,629
VHH#10D	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,619	0,674	0,674
VHH#12B	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,604	0,637
VHH#9E	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,000	0,854
VHH#3F																1,000

Tabla 9: Homologías fraccionales entre VHH anti-TNF-alfa

	% de homología																																					
	MP3D2SRA	MP3A3SR	MP3C5SR	MP3C1SR	MP3G8SR	P3D2BR	MP3H6SRA	MP3B4SRA	MP4E4BR	MP4H6SR	MP2F6SR	MP3D1BR	MP2B5BR	MP2C1BR	MP4A12SR	MP3F4SRA	MP3D3BR	MP3E5BR	MP3C7SRA	MP2F1BR	MP2C5BR	MP2C10BR	MP2G5SR	MP3B1SRA	MP2F10SR	MP3A7SRA	MP4C10SR	MP4D5BR	MP3F1SRA	MP6D6BR	MP6B1BR	MP6A6BR	MP6B12BR	MP6C11BR	MP6B10BR			
MP3D2SRA	X	99	66	66	66	62	71	71	71	70	68	69	65	63	64	68	68	67	68	71	70	68	67	63	67	68	60	72	65	68	67	66	67	76	70			
MP3A3SR	--	X	66	66	66	62	72	72	72	71	70	71	65	63	64	68	66	67	68	72	72	69	67	64	66	67	60	73	65	67	67	65	66	67	71			
MP3C5SR	--	--	X	97	98	73	65	65	64	63	63	60	58	58	64	64	65	66	65	65	65	63	63	64	64	61	67	60	74	63	60	63	60	62	70	65		
MP3C1SR	--	--	--	X	98	72	64	64	64	62	62	58	57	58	65	64	64	65	64	63	64	62	63	64	65	60	67	59	73	63	60	62	70	65				
MP3G8SR	--	--	--	--	X	73	65	65	64	63	63	63	59	58	59	64	64	65	66	65	64	65	63	63	63	65	61	66	60	73	63	61	63	71	64			
MP3D2BR	--	--	--	--	--	X	63	63	63	62	63	64	59	58	58	62	61	62	63	64	63	63	63	64	63	63	63	65	58	73	64	60	63	68	67			
MP3H6SRA	--	--	--	--	--	--	X	100	97	97	80	81	67	68	67	75	71	73	75	73	71	73	71	66	75	75	63	71	69	71	71	68	70	82	70			
MP3B4SRA	--	--	--	--	--	--	--	X	97	97	80	81	67	68	67	75	71	73	75	73	71	73	71	66	75	75	63	71	69	71	71	68	70	82	70			
MP4E4BR	--	--	--	--	--	--	--	--	X	97	81	82	68	69	68	73	70	71	73	73	71	73	71	66	75	75	63	71	69	71	71	68	70	82	70			
MP4H6SR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	61	81	66	66	66	72	69	71	72	71	71	73	71	66	75	75	63	72	70	71	71	68	70	80	71			
MP2F6SR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	94	65	68	64	70	67	69	71	67	65	73	71	63	71	70	62	69	66	67	69	68	67	78	69			
MP3D1BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	65	66	65	71	69	71	72	67	65	70	69	63	71	71	62	68	66	67	69	68	67	78	69			
MP2B5BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	95	97	63	64	64	64	65	63	64	63	60	66	63	57	63	64	65	63	63	62	70	65			
MP2C1BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	95	63	64	64	64	63	61	66	65	59	66	63	56	61	85	65	64	63	62	70	65		
MP4A12SR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	63	64	64	62	60	63	62	59	65	63	56	61	84	64	63	63	62	70	65			
MP3F4SRA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	94	96	69	67	68	68	62	67	69	60	72	63	67	68	65	65	76	71			
MP3D1BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	98	95	70	68	67	67	62	67	67	60	70	64	66	66	64	64	75	69		
MP3E5BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	98	70	68	68	69	63	68	68	60	72	64	67	68	65	66	77	71		
MP3C7SRA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	71	69	69	70	63	69	69	61	72	64	69	68	66	66	78	71		
MP2F1BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	94	66	67	63	68	67	61	70	64	68	65	64	64	74	67		
MP2C5BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	68	67	63	67	65	62	69	63	67	64	62	63	73	67		
MP2C10BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	94	62	68	66	59	67	66	69	68	64	68	74	73		
MP2G5SR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	62	67	65	59	67	65	67	66	64	66	73	73		
MP3B1SRA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	66	65	91	67	60	67	69	68	69	69	65		
MP2F10SR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	97	61	67	65	71	66	65	67	77	68		
MP3A7SRA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	61	68	63	71	65	65	67	77	69		
MP4C10SR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	64	58	65	64	63	66	66	63		
MP4D5BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	64	69	68	65	67	76	73		
MP3F1SRA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	65	64	64	63	71	68		
MP6D6BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	70	65	70	77	73		
MP6B1BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	78	81	76	71	
MP6A6BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	75	74	66
MP6B12BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	73	68
MP6C11BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	77
MP6B10BR	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X

Tabla 10: Porcentajes de homología entre VHH anti-IFN-gamma

ES 2 655 912 T3

Grupo	Animales	Descripción	Programa
1	8	control negativo 1 por vía i.p.	diariamente 100 µl de PBS por vía i.p. +
2	8	control negativo 2 rectal	cada dos días 100 µl de PBS rectal durante 2 semanas
3	8	control negativo 3 intragástrico	diariamente 100 µl de PBS intragástrico durante 14 días consecutivos
4	8	control positivo 1 dexametasona	5 µg por vía i.p. durante 7 días consecutivos
5	8	control positivo 2 <i>L. lactis</i> que expresa IL10	aplicado por vía oral una vez al día durante 14 días consecutivos
6	8	VHH 3F bivalente intragástrico	diariamente 100 µg de VHH 3F ₂ bivalente intragástrico en 14 días consecutivos
7	8	VHH 3F bivalente por vía i.p.	diariamente 100 µg de VHH 3F bivalente por vía i.p. durante 14 días consecutivos
8	8	VHH 3F bivalente por vía rectal	100 µg de VHH 3F bivalente por vía rectal en 100 µl de PBS cada dos días durante dos semanas

Tabla 11: Programa de tratamiento

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido anti-TNF-alfa que comprende
 - 5 - al menos dos anticuerpos de dominio simple anti-TNF-alfa; y
 - al menos un anticuerpo de dominio simple dirigido contra una proteína sérica, en el que dicha proteína sérica es cualquiera de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno.
- 10 2. Polipéptido anti-TNF-alfa según la reivindicación 1, que comprende:
 - dos anticuerpos de dominio simple anti-TNF-alfa; y
 - 15 - un anticuerpo de dominio simple dirigido contra una proteína sérica, en el que dicha proteína sérica es cualquiera de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno.
- 20 3. Polipéptido anti-TNF-alfa según la reivindicación 1 ó 2, que comprende al menos un anticuerpo de dominio simple anti-TNF-alfa que comprende
 - (a) una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 16 y 79 a 84,
 - 25 (b) una secuencia homóloga que presenta una identidad de secuencia de más del 70% con la secuencia original representada por cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 16 y 79 a 84.
- 30 4. Polipéptido anti-TNF-alfa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende al menos un anticuerpo de dominio simple anti-TNF-alfa que comprende
 - (a) una secuencia representada por SEQ ID NO: 1,
 - (b) una secuencia homóloga que presenta una identidad de secuencia de más del 70% con la secuencia original representada por SEQ ID NO: 1.
- 35 5. Polipéptido anti-TNF-alfa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende al menos un anticuerpo de dominio simple anti-TNF-alfa que comprende
 - (a) una secuencia representada por SEQ ID NO: 1,
 - 40 (b) una secuencia homóloga que presente una identidad de secuencia del 80% con la secuencia original representada por SEQ ID NO: 1.
- 45 6. Polipéptido anti-TNF-alfa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el al menos un anticuerpo de dominio simple dirigido contra una proteína sérica está dirigido contra albúmina sérica.
7. Polipéptido anti-TNF-alfa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, en el que los anticuerpos de dominio simple del polipéptido anti-TNF-alfa que se dirigen contra TNF-alfa son de la misma secuencia.
- 50 8. Polipéptido anti-TNF-alfa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que al menos un anticuerpo de dominio simple es un VHH de camélido humanizado.
9. Ácido nucleico que codifica para un polipéptido anti-TNF-alfa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 55 10. Polipéptido anti-TNF-alfa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o ácido nucleico según la reivindicación 9, para su uso en un método para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con procesos inflamatorios.
- 60 11. Polipéptido anti-TNF-alfa o ácido nucleico para su uso según la reivindicación 10, en donde dichos trastornos son cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, diabetes tipo 1, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esterilidad masculina, miastenia grave, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.
- 65 12. Composición que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 9 o un polipéptido anti-TNF-alfa

según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo farmacéutico adecuado.

13. 5 Uso de un polipéptido anti-TNF-alfa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un ácido nucleico según la reivindicación 9, o una composición según la reivindicación 12, para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con procesos inflamatorios.

	FR1		CDR1		FR2
VHH#3G	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGR		TFSAHS--VYTMG		WFRQAPGKEREFA
VHH#3E	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR		TFSDHSGYTYTIG		WFRQAPGKEREFA
VHH#1A	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGF		DFS--VSWMY---		WVRQAPGKGLEWVS
VHH#2B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGF		TFS--DYWMY---		WVRQAPGKGLEWVS
VHH#12B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF		EFE--NHWMY---		WVRQAPGKGLEWVS
VHH#7B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGS		IFRVNA-----MG		WYRQVPGNQREFVA
	*****	*****	*****	*	* * * * *
	CDR2		FR2		
VHH#3G	RIYWSSANTYYADSVKG	RFTISRDN	AKNTVDLLMNSL	KPEDTAVYYCAA	
VHH#3E	RIYWSSGNTYYADSVKG	RFAISRDI	AKNTVDLTMN	LEPEDTAVYYCAA	
VHH#1A	EINTNGLITKYVDSVKG	RFTISRDN	AKNTLYLQMD	SLIPEDTALYYCAR	
VHH#2B	TVNTNGLITRYADSVKG	RFTISRDN	AKYTYLYLQMN	SLKSEDTAVYYCTK	
VHH#12B	TVNTNGLITRYADSVKG	RFTISRDN	AKYTYLYLQMN	SLKSEDTAVYYCTK	
VHH#7B	-IITSGDNLNYADAVKG	RFTISTDN	VKKTVYLQMN	VLKPEDTAVYYCNA	
		* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
	CDR3	FR4	Bisagra		
VHH#3G	RDGIPTSRITVGSYNY	WGQGTQVT	VSS	EPKTPKPQP	
VHH#3E	RDGIPTSRSVESYNY	WGQGTQVT	VSS	EPKTPKPQP	
VHH#1A	-----SPSGSF	RGQGTQVT	VSS	EPKTPKPQP	
VHH#2B	-VVEPYSDSRITNAD	WGQGTQVT	VSS	EPKTPKPQP	
VHH#12B	-VLEPYSDSRITNAD	WGQGTQVT	VSS	EPKTPKPQP	
VHH#7B	--ILQTSRWSIPSNY	WGQGTQVT	VSS	EPKTPKPQP	
		*****	*****	*****	*****

Figura 1

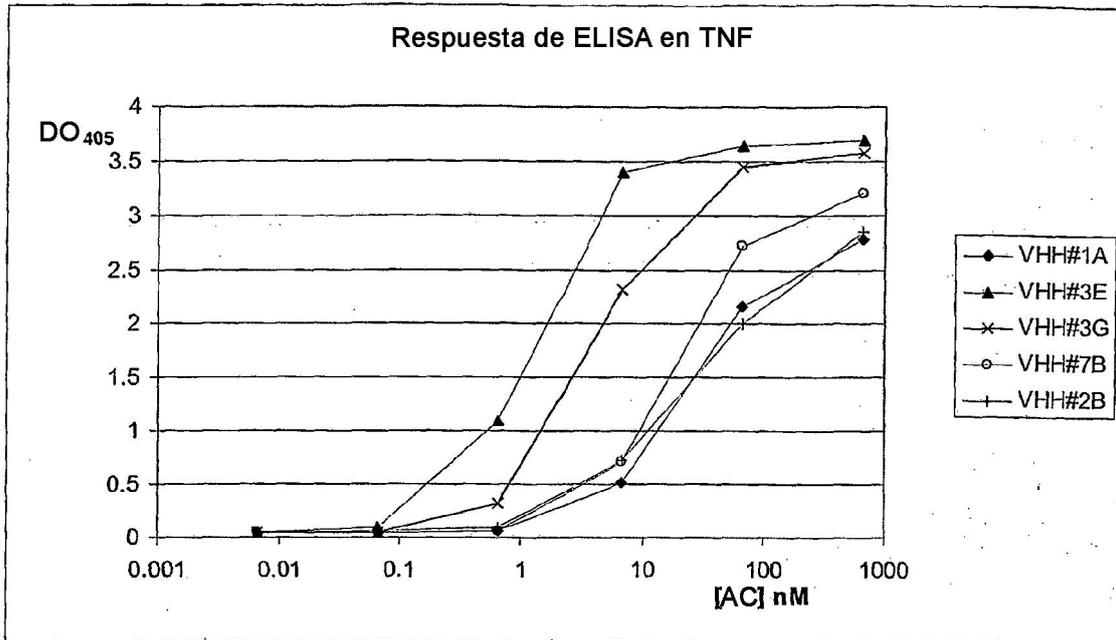


Figura 2

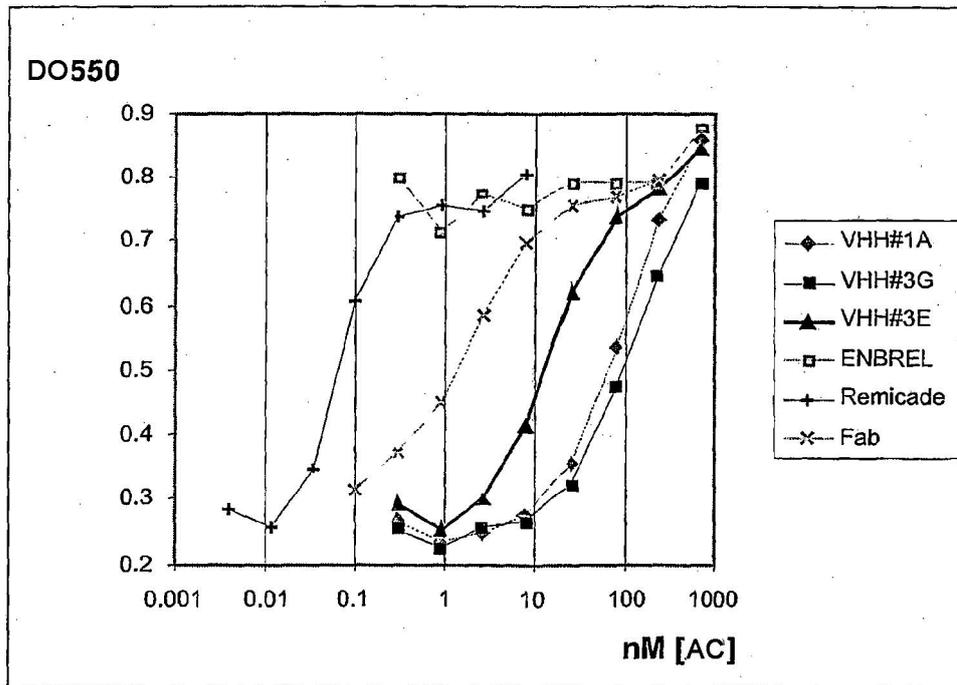


Figura 3

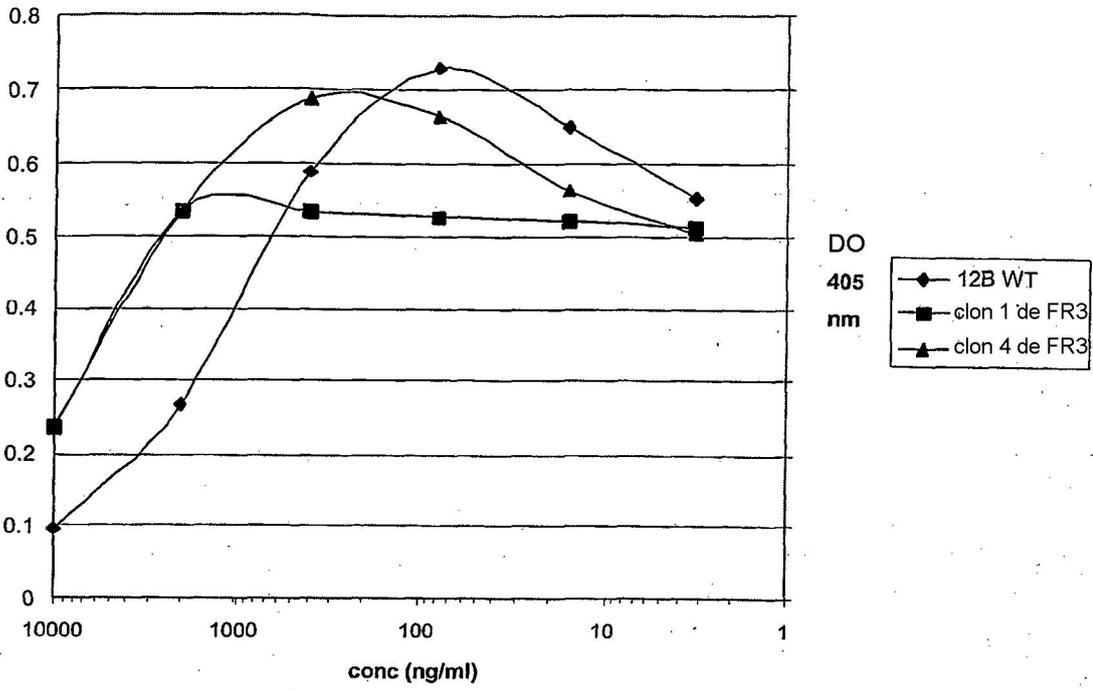


Figura 4

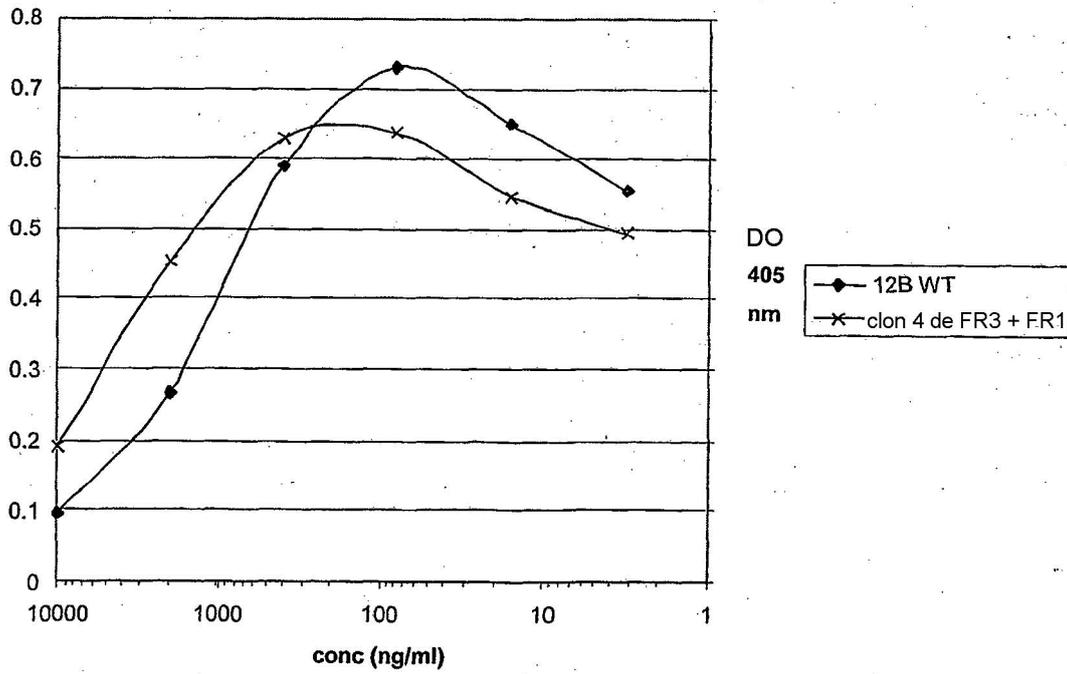


Figura 5

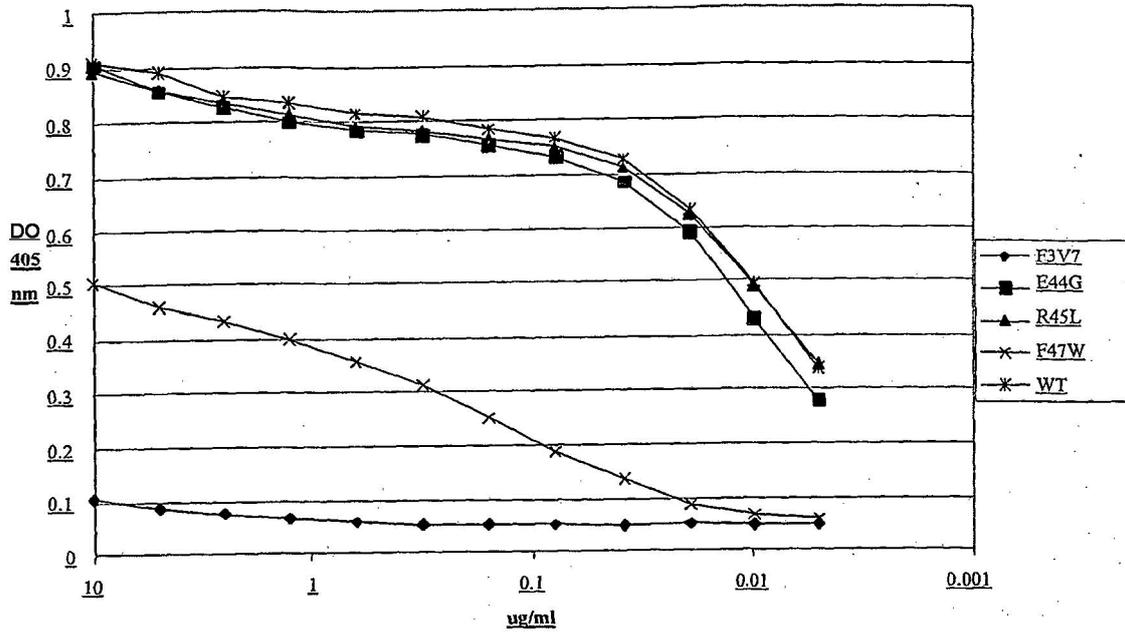


Figura 6

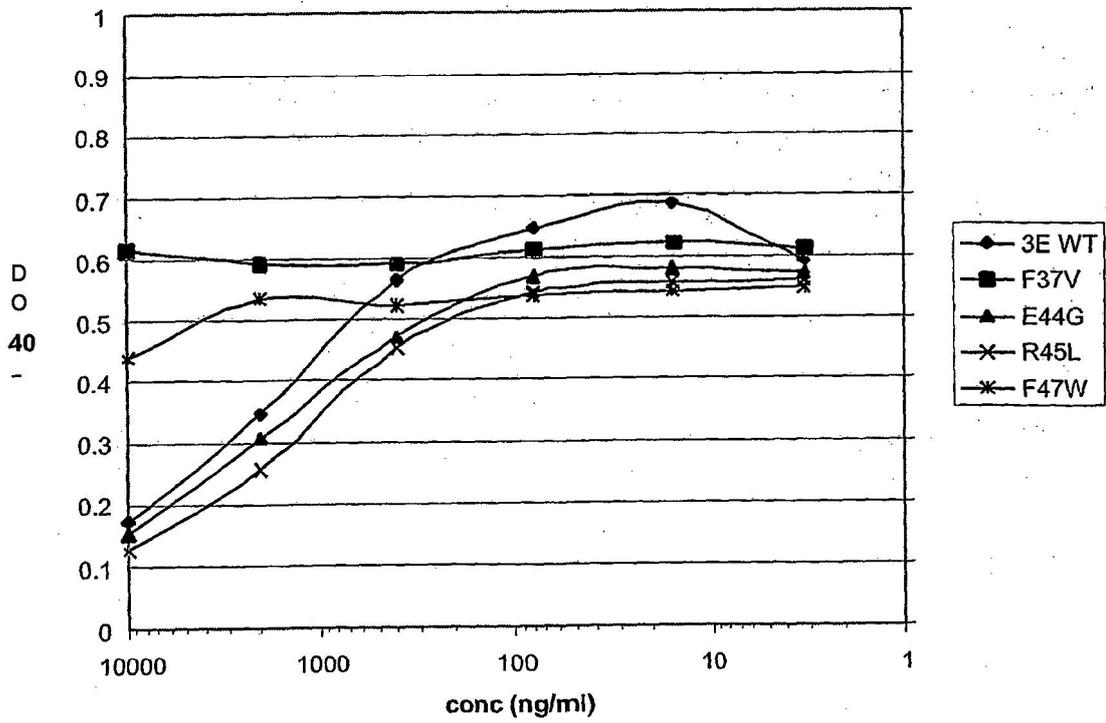


Figura 7

	FR1		CDR1	FR2
VHH#m3F	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLS	CAASGG	TFSSIIMA	WFRQAPGKERE
VHH#m4B	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLS	CGVSGL	SFSGYTMG	WFRQAPGKERE
VHH#m9A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CAASGG	TLSSYITG	WFRQAPGKERE
VHH#m9E	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CAASEG	TLSGYILG	WFRQAPGKERE
	***	*****	*	*
			*****	*

	CDR2		FR2
VHH#m3F	VSWSGGTTVYADSVLG	RFEISRDSARKSVYLQ	MNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m4B	IGWNSGTTVEYRNSVKG	RFTISRDNAKNTVYLQ	MNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m9A	VSWSSSTIVYADSVVGG	RFTISRDNHQNTVYLQ	MDSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m9E	VSWSGGTTIVYADSVKG	RFEISRDNARNNTVYLQ	MDSLKSEDTAVYYCAA
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*

	CDR3	FR4	Bisagra
VHH#m3F	RPYQKYNWA-SASYNV	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#m4B	SP--KYMTAYERSYDF	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#m9A	RPYQKYNWA-SASYNV	WGQGTQVTVSS	-----
VHH#m9E	RPYQRFNWA-SASYNV	WGRGTQVTVSS	-----
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*

Figura 8

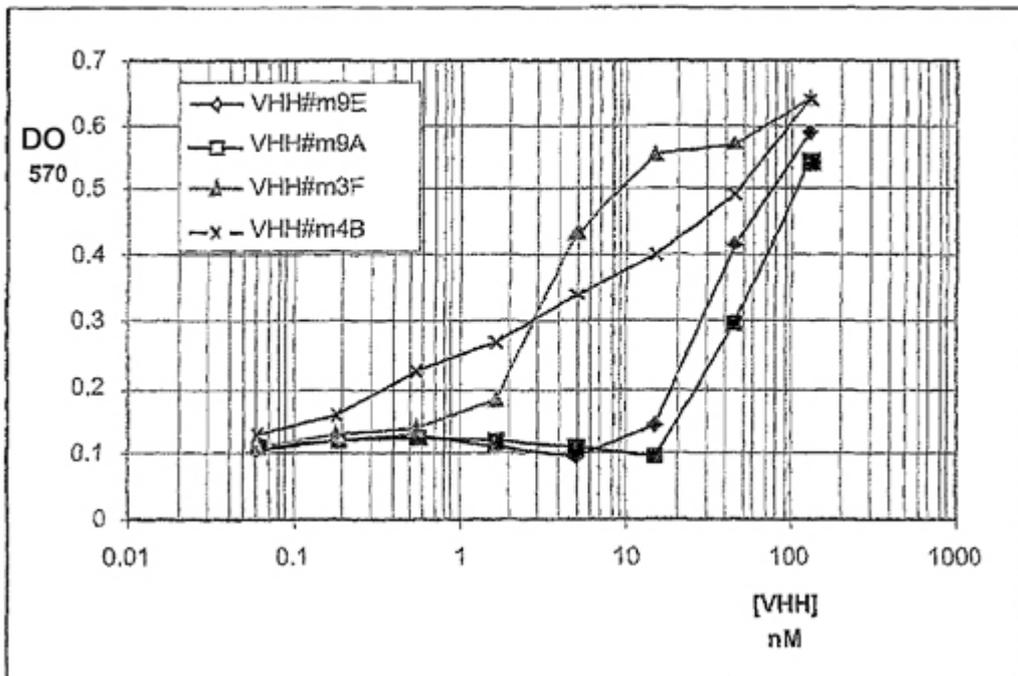


Figura 9

```

HindIII
1  aagcttgcac gcaaattcta tttcaaggag acagtcataa tgaataacct attgectacg gcagccgchg gattgttatt
                                     M K Y L L P T A A A G L L L
                                     <
                                     Líder de pelB

      SfiI   NcoI           NotI           PstI
81  actcgcggcc cagccggcca tggggcctaa tagggcgccg cacaggtgca gotgcaggag tcataatgag ggaccocagg
    L A A Q P A M G P - - A A A Q V Q L Q E S - - G T Q V
    Líder           >>   VHH#1 >           <           VHH#2

EseIII
161  cacogtctcc tcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgcacatca tcatcatcat cattaatgag
      T V S S E Q K L I S E E D L N G A A H H H H H - -
          >>           C-MYC           >           <           His6           >

EcoRI
241  aattcaactgg ccg
    
```

Figura 10

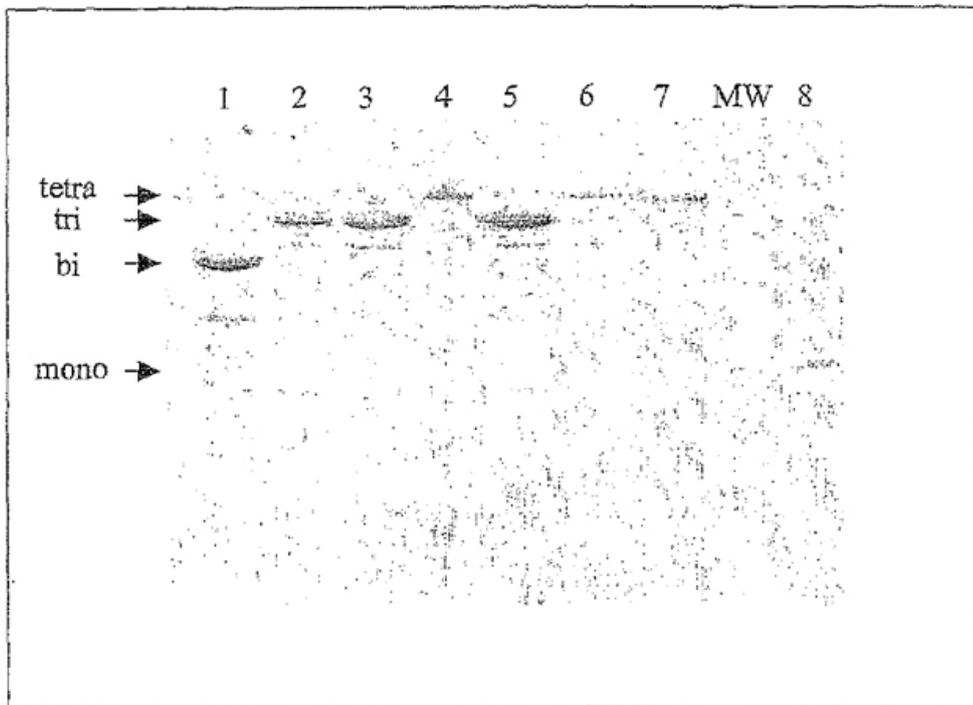


Figura 11

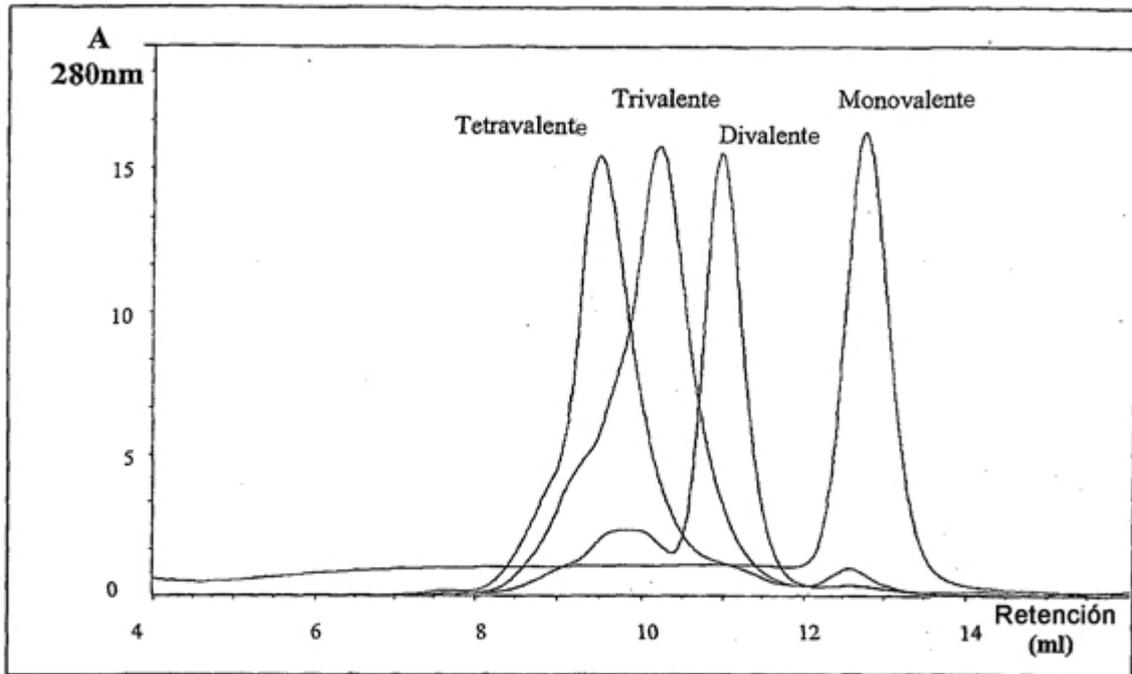


Figura 12

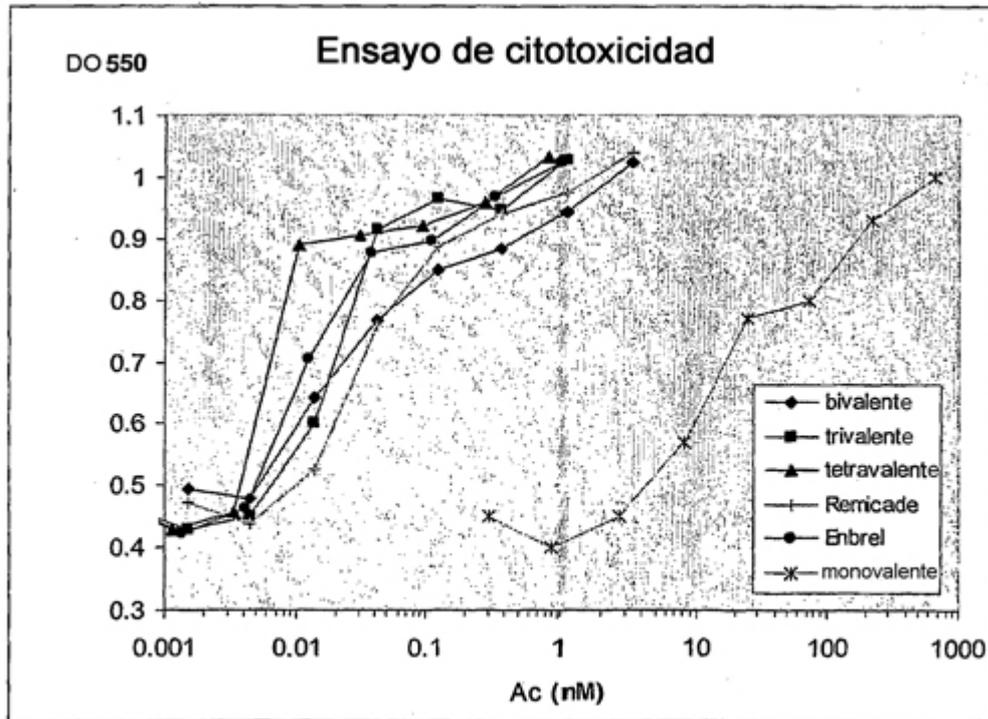


Figura 13

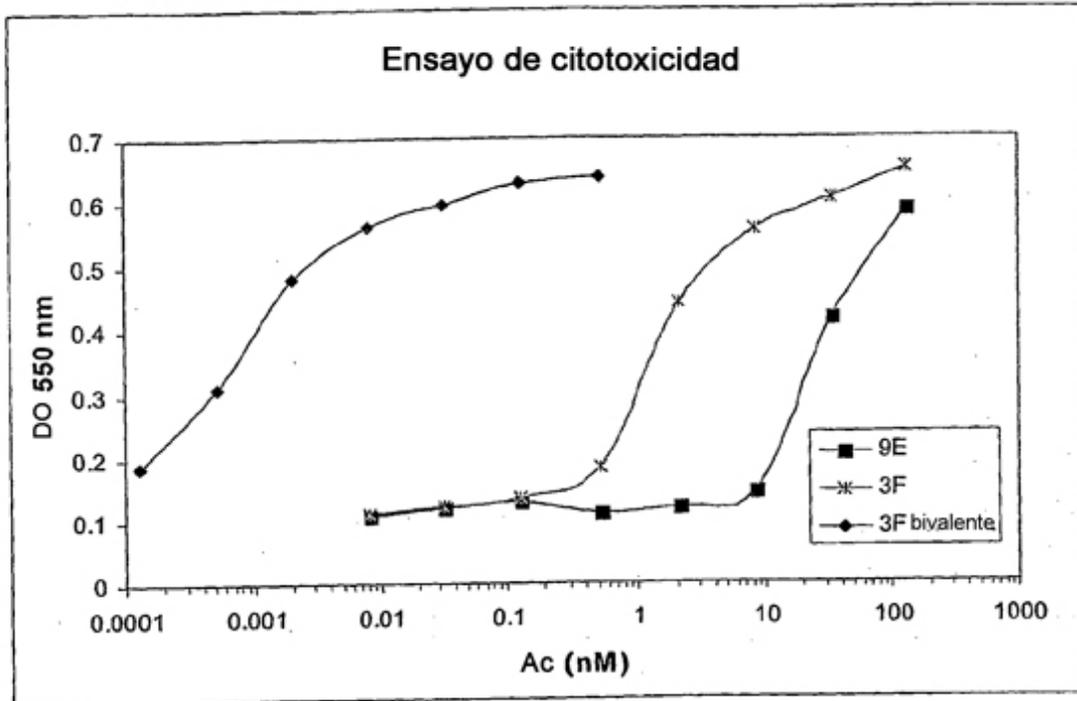


Figura 14

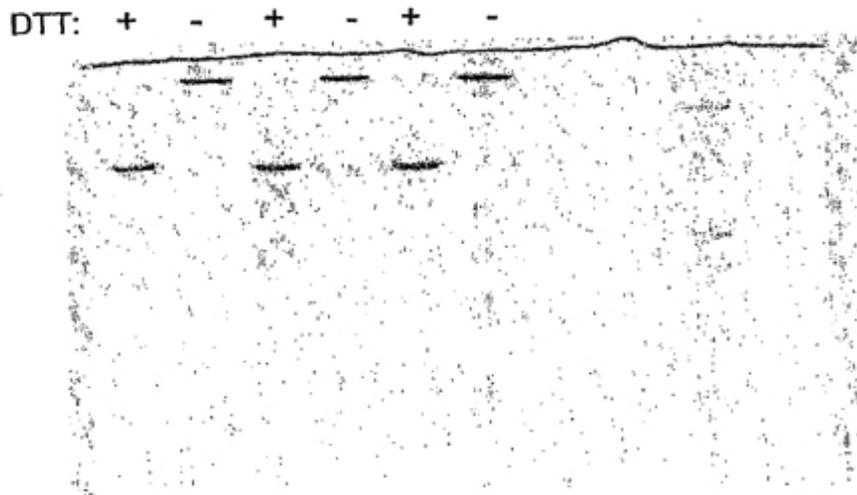


Figura 15

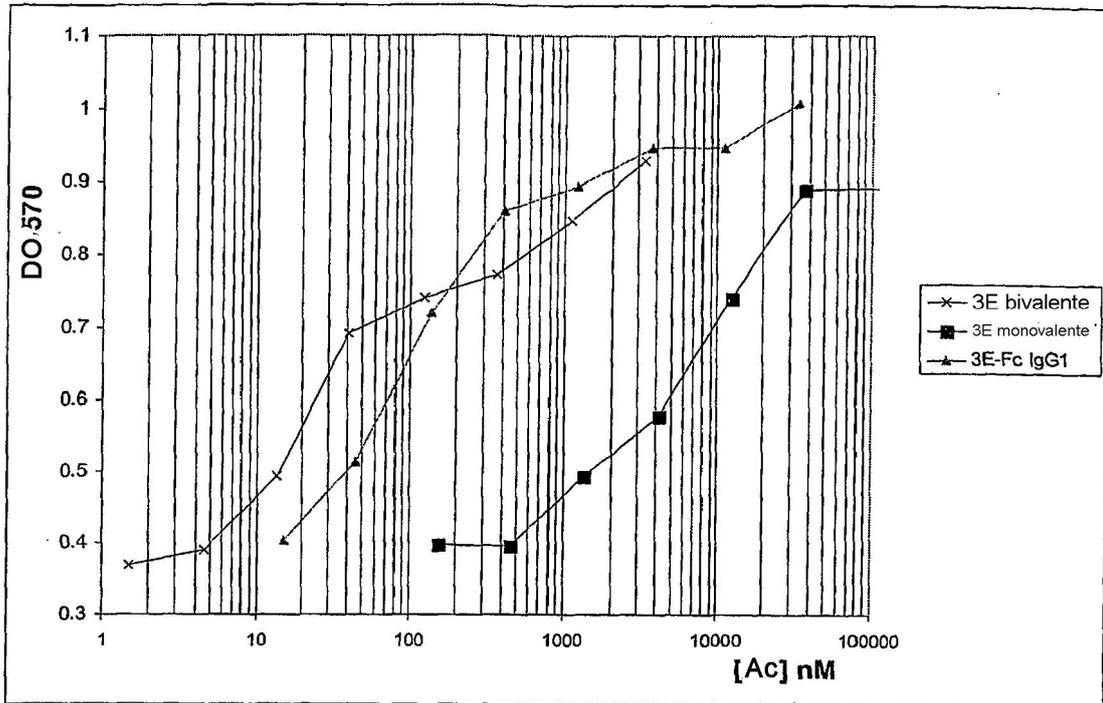


Figura 16

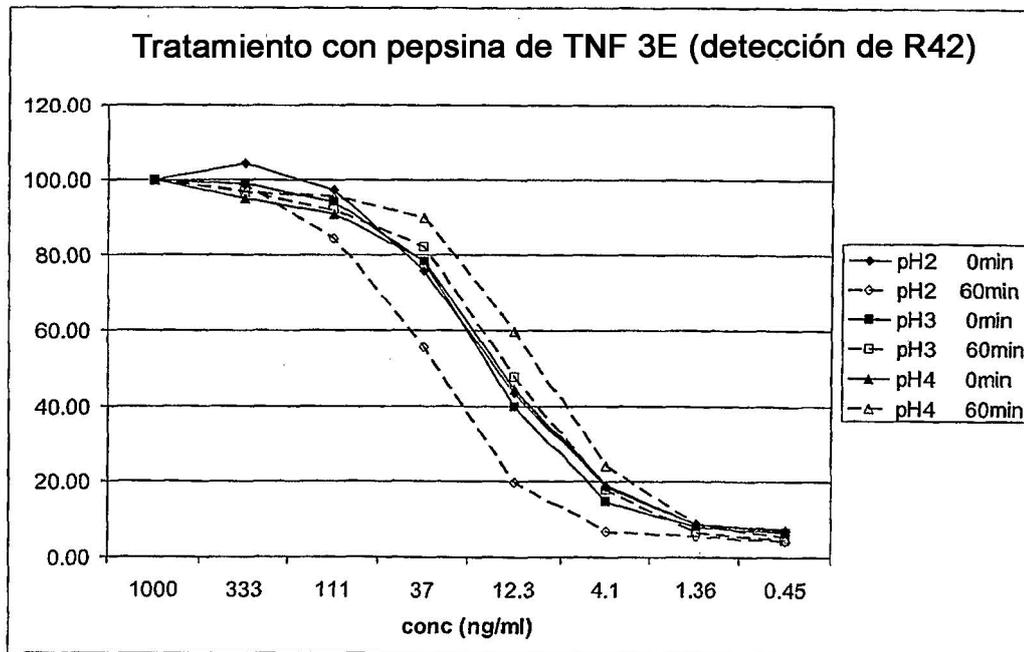


Figura 17

Modelo de colitis crónica inducida por DSS

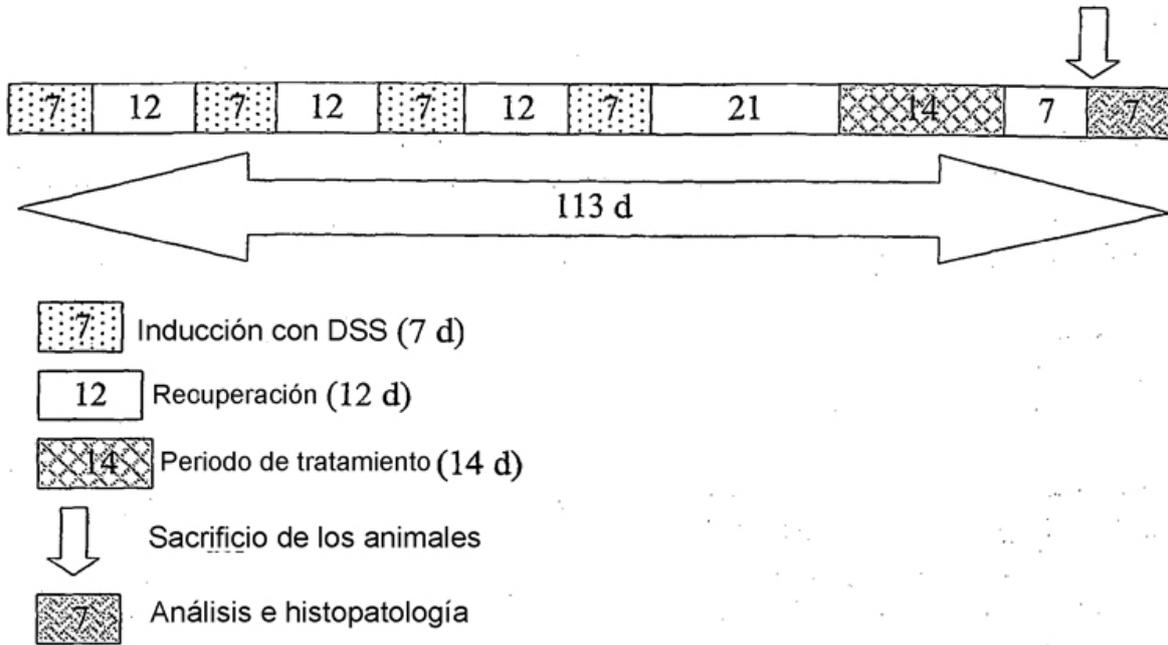


Figura 18