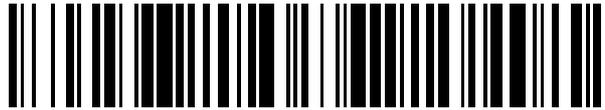


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 418**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2016 PCT/EP2016/077595**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17081320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2016 E 16798122 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 3191511**

54 Título: **Agentes de unión a TNF mejorados**

30 Prioridad:

12.11.2015 US 201562254375 P

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

06.04.2018

73 Titular/es:

**ABLYNX NV (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**BUYSE, MARIE-ANGE;
BOUCNEAU, JOACHIM;
CASTEELS, PETER y
VAN HEEKE, GINO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 662 418 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

Agentes de unión a TNF mejorados

5 **Sumario**

La presente invención se refiere a dominios variables individuales de inmunoglobulina de cadena pesada (también denominados en el presente documento "ISV" o "ISVD") que se unen a factor de necrosis tumoral alfa según la reivindicación adjunta. Otros aspectos, realizaciones, características, usos y ventajas de la invención serán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento.

Antecedentes

En la presente solicitud, los residuos/posiciones de aminoácido en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina se indicarán con la numeración según Kabat. Por motivos de conveniencia, la figura 1 proporciona una tabla que enumera algunas de las posiciones de aminoácido a las que se hará referencia específicamente en el presente documento y su numeración según algunos sistemas de numeración alternativos (tales como Aho e IMGT. Nota: a menos que se indique explícitamente lo contrario, para la presente descripción y reivindicaciones, la numeración de Kabat es decisiva; otros sistemas de numeración se facilitan para referencia sólo).

Con respecto a las CDR, tal como se conoce bien en la técnica, hay múltiples convenciones para definir y describir las CDR de un fragmento de VH o VHH, tal como la definición de Kabat (que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más comúnmente usada) y la definición de Chothia (que se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales). Se hace referencia por ejemplo al sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>. Para los fines de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, aun cuando también puedan mencionarse las CDR según Kabat, las CDR se definen lo más preferiblemente basándose en la definición de Abm (que se basa en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular), ya que se considera que es un compromiso óptimo entre las definiciones de Kabat y Chothia. Se hace de nuevo referencia al sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>.

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC) son enfermedades crónicas, incapacitantes y progresivas. La mayoría de las terapias con fármacos no biológicos tales como aminosalicilatos, esteroides e inmunomoduladores proporcionan una mejora sintomática pero no pueden detener el proceso inflamatorio subyacente y no cambian el transcurso de la enfermedad. El advenimiento de agentes anti-factor de necrosis tumoral- α (anti-TNF- α) (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol) ha cambiado drásticamente el modo en que se trata IBD al cambiar tanto el transcurso de la enfermedad (menos cirugías, menos hospitalizaciones, mejor calidad de vida, ahorro de esteroides, mayor remisión clínica y tasas de cicatrización de la mucosa tanto en CD como en UC) como la calidad de vida de los pacientes y la productividad laboral (véase Amiot y Peyrin-Biroulet 2015 Ther Adv Gastroenterol 8:66-82). La vía de administración más común de estas proteínas terapéuticas es la inyección. Puesto que la mayoría de estas proteínas tienen semividas en suero cortas, es necesario administrarlas frecuentemente o en altas dosis para que sean eficaces. La administración sistémica está asociada además con un mayor riesgo de infecciones. Conjuntamente esto da como resultado una pérdida de conformidad del paciente (véase Singh *et al.* 2008 J Pharm Sci 97:2497-2523).

Sin embargo, las infecciones oportunistas y los efectos secundarios a largo plazo no deseados, incluyendo tuberculosis y linfoma no Hodgkin están provocados por la inmunosupresión generalizada y resultan de inyecciones sistémicas repetidas del tratamiento con anticuerpos monoclonales usado actualmente (Ali *et al.*, 2013; Galloway *et al.*, 2011; Ford & Peyrin-Biroulet, 2013; Kozuch & Hanauer, 2008; Schreiber *et al.*, 2007; Syed *et al.*, 2013).

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

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

En el uso de proteínas señuelo para proteger el anticuerpo terapéutico, Avaxia Biologics Inc. ha realizado recientemente un estudio basado en pacientes que comprende anticuerpos calostrales bovinos policlonales frente a TNF alfa humano (AVX-470) administrados por medio de la vía oral en pacientes con colitis ulcerosa. Sin embargo, el estudio se interrumpió.

Por tanto, existe la necesidad de nuevos fármacos para IBD.

Se conocen bien en la técnica ISVD (y en particular Nanobodies) que pueden unirse a TNF y sus usos, por ejemplo de los documentos WO 2004/041862 y WO 2006/122786, que describen Nanobodies contra TNF y su uso para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con y/o mediados por TNF- α o señalización por TNF- α , tales como inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, parotitis autoinmunitaria, diabetes

tipo 1, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, miastenia grave, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

5 El documento WO 2006/122786 divulgó como SEQ ID NO: 125 un Nanobody anti-TNF- α específico denominado NC55TNF_NC7 (PMP6C11). La secuencia de este Nanobody de la técnica anterior se facilita en la tabla A más adelante como SEQ ID NO: 58. La tabla A también facilita (como SEQ ID NO: 1) la secuencia de una versión de secuencia optimizada (también denominada en el presente documento "Referencia A") de este agente de unión a TNF de la técnica anterior, junto con sus CDR (según las convenciones de Kabat y Abm). Tal como puede observarse a partir de la alineación de la figura 2, esta versión de secuencia optimizada contiene, en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 58 de la técnica anterior, las siguientes mutaciones: Q1E, A14P, Q27F, S29F, P40A, A49S, K73N, Q75K, V78L, D82aN, K83R y Q108L (según la numeración de Kabat).

15 El documento WO 2015/1733256 se refiere a dominios de inmunoglobulina mejorados, que comprenden extensiones C-terminales que impiden la unión de los denominados anticuerpos preexistentes ("PEA"). El documento WO 2015/1733256 divulga SEQ ID NO: 345 como un Nanobody anti-TNF- α específico, que se denomina también en el presente documento TNF345 (SEQ ID NO: 59). Tal como puede observarse a partir de la alineación de la figura 2, la versión de secuencia optimizada Referencia A contiene, en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 59 de la técnica anterior, las siguientes mutaciones: V11L y L89V (según la numeración de Kabat).

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

25 El documento WO2007/025977 describe un tratamiento de enterocolitis crónica, que implica la secreción *in situ* de Nanobodies anti-mTNF por bacterias *L. lactis* administradas por vía oral.

30 Sumario de la invención

La presente invención se dirige proporcionar agentes de unión a TNF mejorados tales como ISVD anti-TNF. Los agentes de unión a TNF mejorados proporcionados por la invención también se denominan en el presente documento "agentes de unión a TNF de la invención" o "agentes de unión a TNF".

35 Más en particular, la presente invención se dirige a proporcionar agentes de unión a TNF mejorados que serían útiles en el tratamiento de enfermedades del tracto digestivo tales como por ejemplo enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, mucositis, estomatitis aftosa, enfermedad celiaca, traumatismo en el tracto digestivo y cánceres en el tracto digestivo. Esos agentes de unión a TNF deben ser preferiblemente estables y propensos a administración oral.

45 Se espera que los agentes de unión a TNF administrados por vía oral no sólo neutralicen TNF en la luz del tracto digestivo, sino que también accedan a la lámina propia y submucosa ya que la barrera intestinal del tracto digestivo puede verse violada o comprometida a través de inflamación macroscópica y/o ulceración, incluyendo pero sin limitarse a enfermedad periodontal, estomatitis aftosa, infecciones bacterianas, virales, fúngicas o parasitarias del tracto digestivo, úlceras pépticas, úlceras asociadas con estrés o infección por *H. pylori*, daño provocado por reflujo esofágico, enfermedad inflamatoria intestinal, daño provocado por cáncer del tracto digestivo, intolerancia alimentaria, incluyendo enfermedad celiaca, o úlceras inducidas por AINE u otros fármacos ingeridos o administrados de manera sistémica.

50 Por tanto, la invención se dirige a proporcionar agentes de unión a TNF mejorados que son variantes de la Referencia A y que tienen una unión reducida a factores de interferencia (generalmente denominados "anticuerpos preexistentes" o "PEA") que pueden estar presentes en los sueros de sujetos humanos sanos así como de pacientes. Se hace referencia a los documentos WO 2012/175741, WO 2013/024059 y también, por ejemplo, a Holland *et al.* (J. Clin. Immunol. 2013, 33(7):1192-203) así como a la solicitud PCT publicada en tramitación junto con la presente WO2015/173325 (n.º de sol. PCT/EP2015/060643) de Ablynx N.V. presentada el 13 de mayo de 2015 y titulada "Dominios variables de inmunoglobulina mejorados".

60 Tal como se describirá adicionalmente en el presente documento, los agentes de unión a TNF de la invención tienen preferiblemente la misma combinación de CDR (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) tal como están presentes en la Referencia A.

65 El agente de unión a TNF de la invención es un dominio variable individual de inmunoglobulina (ISVD) que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 40.

Algunos agentes de unión a TNF preferidos, pero no limitativos de la divulgación se enumeran en la figura 3 como

SEQ ID NO: 8 a 41, 62, 63, 64, 65, 66 y 69. La figura 4 muestra una alineación de las secuencias SEQ ID NO: 8-41 con SEQ ID NO: 1 (Referencia A) y SEQ ID NO: 58 (PMP6C11). Los agentes de unión de SEQ ID NO: 22 a 41, 62-66 y 69 son ejemplos de agentes de unión a TNF de la divulgación que tienen una extensión de alanina C-terminal, es decir un residuo de alanina en el extremo C-terminal de la secuencia de ISVD (denominado algunas veces "posición 114") en comparación con la secuencia C-terminal habitual VTVSS (SEQ ID NO: 55, tal como se presenta en la Referencia A). Tal como se describe en el documento WO 2012/175741 (pero también por ejemplo en los documentos WO 2013/024059 y WO2015/173325), esta extensión de alanina C-terminal puede impedir la unión de los denominados "anticuerpos preexistentes" (que se supone que son IgG) a un epítipo supuesto que está situado en la región C-terminal del ISVD. Se supone que este epítipo incluye, entre otros residuos, los residuos de aminoácido expuestos en la superficie de la secuencia C-terminal VTVSS así como el residuo de aminoácido en la posición 14 (y los residuos de aminoácido próximos/cercanos al mismo en la secuencia de aminoácidos, tal como las posiciones 11, 13 y 15) y también puede comprender el residuo de aminoácido en la posición 83 (y los residuos de aminoácido próximos/cercanos al mismo en la secuencia de aminoácidos, tal como las posiciones 82, 82a, 82b y 84) y/o el residuo de aminoácido en la posición 108 (y los residuos de aminoácido próximos/cercanos al mismo en la secuencia de aminoácidos, tal como la posición 107).

Sin embargo, aunque la presencia de una alanina C-terminal de este tipo (o una extensión C-terminal generalmente) puede reducir en gran medida (y en muchos casos incluso impedir de manera esencialmente completa) la unión de los "anticuerpos preexistentes" que pueden encontrarse en los sueros de una gama de sujetos (tanto sujetos sanos así como pacientes), se ha encontrado que los sueros de algunos sujetos (tales como los sueros de pacientes con algunas enfermedades inmunitarias tales como SLE) pueden contener anticuerpos preexistentes que pueden unirse a la región C-terminal de un ISVD (cuando tal región está expuesta) aun cuando el ISVD contenga una alanina C-terminal de este tipo (o más generalmente, tal extensión C-terminal). Se hace referencia de nuevo a la solicitud PCT publicada en tramitación junto con la presente WO2015/173325 del cesionario presentada el 13 de mayo de 2015 y titulada "*Dominios variables de inmunoglobulina mejorados*".

Por consiguiente, un objetivo específico de la invención es proporcionar agentes de unión a TNF que sean variantes mejoradas del Nanobody anti-TNF denominado en el presente documento "Referencia A" y que tengan una unión reducida a los denominados "anticuerpos preexistentes", y en particular del tipo descrito en el documento WO2015/173325 (es decir, los anticuerpos preexistentes que pueden unirse a una región C-terminal expuesta de un ISVD incluso en presencia de una extensión C-terminal).

Generalmente, la invención logra este objetivo proporcionando un dominio variable individual de inmunoglobulina (ISVD) que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 40. También se divulgan secuencias de aminoácidos que son variantes de la secuencia de SEQ ID NO: 1 que comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1):

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

En particular, en los agentes de unión a TNF proporcionados por la divulgación:

- el residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V; y
- el residuo de aminoácido en la posición 89 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, V o L; y
- el residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, K o Q; y
- el residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de manera adecuada de S, K o Q;

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

posición 11 es V y la posición 110 es K o Q; o (vii) la posición 11 es V y la posición 112 es K o Q.

5 De las secuencias de aminoácidos proporcionadas por la divulgación, las secuencias de aminoácidos en las que la posición 89 es T o en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L (opcionalmente en combinación adecuada con una mutación 110K o 110Q y/o una mutación 112K o 112Q, y en particular en combinación con una mutación 110K o 110Q) se prefieren particularmente. Incluso se prefieren más secuencias de aminoácidos en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L, opcionalmente con una mutación 110K o 110Q.

10 En un ejemplo particularmente preferido, en los agentes de unión a TNF proporcionados por la divulgación, el residuo de aminoácido en la posición 11 es V, el residuo de aminoácido en la posición 89 es L, el residuo de aminoácido en la posición 110 es T y el residuo de aminoácido en la posición 112 es S.

15 En un ejemplo particularmente preferido, la presente divulgación se refiere a agentes de unión a TNF, tales como dominios variables individuales de inmunoglobulina (ISVD), que tienen:

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

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

20 - una CDR3 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4);

y que tiene:

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

y/o

30 - no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

y

40 - el residuo de aminoácido en la posición 11 es V; y

- el residuo de aminoácido en la posición 89 es L; y

45 - el residuo de aminoácido en la posición 110 es T; y

- el residuo de aminoácido en la posición 112 es S; y

- el residuo de aminoácido en la posición 49 es A; y

50 - el residuo de aminoácido en la posición 74 es S.

Tal como se menciona, las secuencias de aminoácidos proporcionadas por la invención descrita en la reivindicación adjunta pueden unirse (y en particular, pueden unirse específicamente) a TNF.

55 Las secuencias de aminoácidos proporcionadas por la invención tienen preferiblemente un valor de CE50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor de 50 nM, más preferiblemente mejor de 25 nM, tal como menor de 10 nM.

60 La tabla B enumera algunas posibles combinaciones no limitativas de los residuos de aminoácido que pueden estar presentes en las posiciones 11, 89, 110 y 112 en los agentes de unión a TNF de la divulgación. Las combinaciones que se prefieren particularmente se indican en **negrita**, y las combinaciones más preferidas se indican en **negrita/subrayado**.

65 Sin embargo, tras optimizar las secuencias (“optimización de secuencias”) de los agentes de unión a TNF con respecto a minimizar o eliminar sitios de unión para anticuerpos preexistentes por un lado y humanizar por otro lado, diversas propiedades de los agentes de unión a TNF, incluyendo la estabilidad, se vieron influidas negativamente

(de manera notable). En particular, la temperatura de fusión como medida de la estabilidad física disminuyó, la producción en tanto el huésped eucariota *P. pastoris* como el huésped procariota *E. coli* disminuyó, y la estabilidad en fluidos GI se redujo.

5 En lugar de “someter a retromutación” los sitios de unión para PEA y las mutaciones humanizantes, comprometiendo de ese modo la optimización de secuencias, los presentes inventores encontraron sorprendentemente que los residuos de aminoácido 49 y/o 74 podían alterarse de manera que ambos requisitos mutuamente excluyentes aparentemente se satisficieran. Las tablas B-1 y B-2 enumeran algunas posibles combinaciones no limitativas de los
10 residuos de aminoácido que pueden estar presentes en las posiciones 11, 89, 110, 112, 49 y/o 74 en los agentes de unión a TNF de la divulgación.

Los agentes de unión a TNF proporcionados por la divulgación se describen adicionalmente en la descripción, los ejemplos y las figuras en el presente documento, es decir tienen CDR que son tal como se describen en el presente documento y tienen un grado global de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la
15 secuencia de SEQ ID NO: 1 que es tal como se divulga en el presente documento y/o pueden tener un número limitado de “diferencias de aminoácidos” (tal como se describe en el presente documento) con (una de) estas secuencias de referencia.

Los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden las siguientes CDR (según la convención de Kabat):

- 20 - una CDR1 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 2); y
- una CDR2 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 3); y
- 25 - una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4).

Alternativamente, cuando las CDR se facilitan según la convención de Abm, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden las siguientes CDR:

- 30 - una CDR1 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y
- una CDR2 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y
- 35 - una CDR3 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4).

Un agente de unión a TNF de la divulgación tiene preferiblemente también:

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

- 45 - no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR).

50 Con respecto a los diversos aspectos y aspectos preferidos de los agentes de unión a TNF de la divulgación, cuando se trata del grado de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 1 y/o el número y la clase de “diferencias de aminoácidos” que pueden estar presentes en un agente de unión de este tipo de la invención (es decir, en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1), debe indicarse que, cuando se dice que (i) una secuencia de aminoácidos de la invención tiene un grado de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 de al
55 menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% (en la que las CDR, cualquier extensión C-terminal que pueda estar presente, así como las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 requeridas por el aspecto específico implicado, no se tienen en cuenta para determinar el grado de identidad de secuencia); y/o cuando se dice que (ii) una secuencia de aminoácidos de la invención tiene no más de 7, preferiblemente no más de 5, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” con la secuencia de SEQ ID NO: 1
60 (de nuevo, sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente y sin tener en cuenta las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 requeridas por el aspecto específico implicado), entonces esto también incluye secuencias que no tienen diferencias de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 1 distintas de las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 requeridas por el aspecto específico implicado) y cualquier extensión C-terminal que pueda estar presente.

65 Por tanto, en un aspecto específico de la divulgación, los agentes de unión a TNF de la invención pueden tener el

100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 (incluyendo las CDR, pero sin tener en cuenta la(s) mutación/mutaciones o combinación de mutaciones en las posiciones 11, 49, 74, 89, 110 y/o 112 divulgadas en el presente documento, y/o cualquier extensión C-terminal que pueda estar presente) y/o pueden no tener diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 (es decir distintas de la(s) mutación/mutaciones o combinación de mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 divulgadas en el presente documento y cualquier extensión C-terminal que pueda estar presente).

Cuando está presente cualquier diferencia de aminoácidos (es decir además de cualquier extensión C-terminal y las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 que requiere el aspecto específico de la invención implicado), estas diferencias de aminoácidos pueden estar presentes en las CDR y/o en las regiones de entramado, pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado (tal como se definen por la convención de Abm, es decir no en las CDR tal como se definen según la convención de Abm), es decir de manera que los agentes de unión a TNF de la divulgación tienen las mismas CDR (definidas según la convención de Abm) que están presentes en SEQ ID NO: 1.

Además, cuando un agente de unión a TNF de la divulgación según cualquier aspecto de la invención tiene una o más diferencias de aminoácidos con la secuencia de SEQ ID NO: 1 (además de las mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 que requiere el aspecto específico implicado), entonces algunos ejemplos específicos, pero no limitativos de tales mutaciones/diferencias de aminoácidos que pueden estar presentes (es decir en comparación con las secuencias de SEQ ID NO: 1) son por ejemplo E1D, P40A, P40L, P40S (y en particular P40A), S49A, A74S, L78V, T87A o cualquier combinación adecuada de las mismas. Además, los agentes de unión a TNF de la divulgación pueden comprender adecuadamente (una combinación adecuada de) las mutaciones D60A, E61D y/o P62S, en particular como un motivo ADS en las posiciones 60-62 (véase SEQ ID NO: 39 para un ejemplo no limitativo). Otros ejemplos de mutaciones son (una combinación adecuada de) una o más sustituciones "humanizantes" adecuadas; se hace referencia por ejemplo al documento WO 2009/138519 (o en la técnica anterior mencionado en el documento WO 2009/138519) y al documento WO 2008/020079 (o en la técnica anterior mencionado en el documento WO 2008/020079), así como a las tablas A-3 a A-8 del documento WO 2008/020079 (que son listas que muestran posibles sustituciones humanizantes).

De las mutaciones mencionadas anteriormente, se prefiere la presencia de una mutación S49A, A74S y/o L78V (o cualquier combinación adecuada de dos cualesquiera de las mismas, incluyendo las tres de las mismas) (véanse SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63). La figura 5 muestra una alineación de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 36 a 41.

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

De manera similar, cuando se usa un agente de unión a TNF de la invención en formato monovalente, tiene preferiblemente tanto una extensión C-terminal $X_{(n)}$ tal como se describe en el presente documento como una D en la posición 1.

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

Por medio de ejemplos preferidos, pero no limitativos, SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38 y 62-63 también son ejemplos de agentes de unión a TNF de la divulgación que tienen diferencias adicionales de aminoácidos con SEQ ID NO: 1, es decir S49A, A74S y/o L78V. Por tanto, en un aspecto específico, la invención se refiere a agentes de unión a TNF de la invención (es decir, que tienen mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 tal como se describe en el presente documento y que son además tal como se describe en el presente documento) que tienen al menos una combinación adecuada de una mutación S49A, A74S y/o L78V, y preferiblemente una combinación

adecuada de dos cualesquiera de estas mutaciones, tales como las tres de estas mutaciones.

- Los agentes de unión a TNF de la invención, cuando se usan en un formato monovalente y/o cuando están presentes en y/o forman el extremo C-terminal de la proteína, polipéptido u otro compuesto o constructo en el que están presentes (o cuando de otro modo tienen un extremo C-terminal "expuesto" en tal proteína, polipéptido u otro compuesto o constructo, por lo que generalmente quiere decirse que el extremo C-terminal del ISV no está asociado con o unido a un dominio constante (tal como un dominio CH1); se hace de nuevo referencia a los documentos WO 2012/175741 y WO 2015/1733256), también tienen preferiblemente una extensión C-terminal de fórmula $(X)_n$, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 ó 5 (y preferiblemente 1 ó 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente que se produce de manera natural) que se elige independientemente de residuos de aminoácido que se producen de manera natural (aunque según un aspecto preferido, no comprende ningún residuo de cisteína), y se elige preferiblemente de manera independiente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I).
- Según algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales extensiones C-terminales $X_{(n)}$, X y n pueden ser tal como sigue a continuación:
- (a) n = 1 y X = Ala;
- (b) n = 2 y cada X = Ala;
- (c) n = 3 y cada X = Ala;
- (d) n = 2 y al menos una X = Ala (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile);
- (e) n = 3 y al menos una X = Ala (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile);
- (f) n = 3 y al menos dos X = Ala (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile);
- (g) n = 1 y X = Gly;
- (h) n = 2 y cada X = Gly;
- (i) n = 3 y cada X = Gly;
- (j) n = 2 y al menos una X = Gly (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile);
- (k) n = 3 y al menos una X = Gly (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile);
- (l) n = 3 y al menos dos X = Gly (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile);
- (m) n = 2 y cada X = Ala o Gly;
- (n) n = 3 y cada X = Ala o Gly;
- (o) n = 3 y al menos una X = Ala o Gly (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile); o
- (p) n = 3 y al menos dos X = Ala o Gly (eligiéndose independientemente el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) de cualquier aminoácido que se produzca de manera natural pero eligiéndose preferiblemente de Val, Leu y/o Ile);
- prefiriéndose particularmente los aspectos (a), (b), (c), (g), (h), (i), (m) y (n), prefiriéndose los aspectos en los que n = 1 ó 2 y prefiriéndose particularmente los aspectos en los que n = 1.
- Debe indicarse que, preferiblemente, cualquier extensión C-terminal presente en un agente de unión a TNF de la invención no contiene un residuo de cisteína (libre) (a menos que dicho residuo de cisteína se use o se destine para funcionalización adicional, por ejemplo, para pegilación).
- Algunos ejemplos específicos, pero no limitativos de extensiones C-terminales útiles son las siguientes secuencias de aminoácidos: A, AA, AAA, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA o GAG.

5 Cuando los agentes de unión a TNF de la divulgación contienen mutaciones en las posiciones 110 ó 112 (opcionalmente en combinación con mutaciones en la posición 11 y/o 89 tal como se describe en el presente documento), los residuos de aminoácido C-terminales de la región de entramado 4 (que comienza a partir de la posición 109) pueden ser tal como sigue: (i) si no está presente ninguna extensión C-terminal: VTVKS (SEQ ID NO: 43), VTVQS (SEQ ID NO: 44), VKVSS (SEQ ID NO: 45) o VQVSS (SEQ ID NO: 46); o (ii) si está presente una extensión C-terminal: VTVKSX_(n) (SEQ ID NO: 47), VTVQSX_(n) (SEQ ID NO: 48), VKVSSX_(n) (SEQ ID NO: 49) o VQVSSX_(n) (SEQ ID NO: 50), tal como VTVKSA (SEQ ID NO: 51), VTVQSA (SEQ ID NO: 52), VKVSSA (SEQ ID NO: 53) o VQVSSA (SEQ ID NO: 54). Cuando los agentes de unión a TNF de la divulgación no contienen mutaciones en las posiciones 110 ó 112 (sino sólo mutaciones en la posición 11 y/o 89 tal como se describe en el presente documento), los residuos de aminoácido C-terminales de la región de entramado 4 (que comienza a partir de la posición 109) serán habitualmente o bien: (i) cuando no está presente ninguna extensión C-terminal: VTVSS (SEQ ID NO: 55) (como en la secuencia de SEQ ID NO: 1); o bien (ii) cuando está presente una extensión C-terminal: VTVSSX_(n) (SEQ ID NO: 56) tal como VTVSSA (SEQ ID NO: 57). En estas secuencias C-terminales, X y n son tal como se definieron en el presente documento para las extensiones C-terminales.

20 Tal como puede observarse a partir de la alineación de la figura 4 así como de la figura 3, los agentes de unión a TNF de SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63 tienen todos una mutación E1D y una extensión de alanina C-terminal. Tal como se mencionó, la presencia de tanto una D en la posición 1 así como una extensión C-terminal hacen que estos agentes de unión a TNF (y otros agentes de unión a TNF de la invención con una D en la posición 1 y una extensión C-terminal) sean particularmente adecuados para su uso en un formato monovalente (es decir, para los fines descritos en el presente documento).

25 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un agente de unión a TNF de la invención (que es tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que tiene una D en la posición 1 y una extensión C-terminal X_(n) (que es preferiblemente un único residuo de Ala). Dichos agentes de unión a TNF están preferiblemente (se usan y/o destinan para su uso) en un formato monovalente. En un aspecto específico, dicho agente de unión a TNF monovalente es SEQ ID NO: 40.

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

35 Algunos agentes de unión a TNF particularmente preferidos de la divulgación son las secuencias de SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41 y 62-63 (o, tal como se describe en el presente documento, variantes de las mismas con una E en la posición 1 y/o sin una extensión C-terminal, dependiendo de su uso previsto en un polipéptido o compuesto de la divulgación).

40 Por tanto, en un primer aspecto, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

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

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

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

y que tiene:

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

55 y/o

60 - no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 "diferencias de aminoácidos" (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

y que tiene opcionalmente:

65 - una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 ó 5 (y

ES 2 662 418 T3

preferiblemente 1 ó 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente que se produce de manera natural) que se elige independientemente, y se elige preferiblemente de manera independiente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I);

5 en el que:

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

10

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

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

- el residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de manera adecuada de S, K o Q;

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

20 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

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

25

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

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

y que tiene:

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

35 y/o

- no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

40

y que tiene opcionalmente:

45

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

50

dominio variable individual de inmunoglobulina que comprende los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

55

- 89T; o

- 89L en combinación con 11V; o

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

60

- 89L en combinación con 112K o 112Q; o

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

65

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

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

- 11V en combinación con 112K o 112Q.

5 En particular, los agentes de unión a TNF de la divulgación tienen preferiblemente no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR).

15 En particular, en los agentes de unión a TNF proporcionados por la divulgación, el residuo de aminoácido en la posición 11 es V, el residuo de aminoácido en la posición 89 es L, el residuo de aminoácido en la posición 110 es T y el residuo de aminoácido en la posición 112 es S.

20 Tal como se describió en el presente documento, algunos ejemplos específicos, pero no limitativos de tales mutaciones/diferencias de aminoácidos que pueden estar presentes (es decir, en combinación adecuada) son, por ejemplo, E1D, P40A, P40L, P40S (y en particular P40A), S49A, A74S, L78V, T87A o cualquier combinación adecuada de las mismas, así como por ejemplo (una combinación adecuada de) las mutaciones D60A, E61D y/o P62S (en particular como un motivo ADS en las posiciones 60-62) y (una combinación adecuada de, véase por ejemplo SEQ ID NO: 39) una o más sustituciones “humanizantes” adecuadas. Tal como también se menciona, se prefiere la presencia de una mutación S49A, A74S y/o L78V (o cualquier combinación adecuada de dos cualesquiera de las mismas, incluyendo las tres de las mismas) (así como la presencia de una D en la posición 1 cuando el agente de unión a TNF está presente en y/o forma el extremo N-terminal de un compuesto o polipéptido de la divulgación o está en formato monovalente).

El agente de unión a TNF de la invención tal como un ISVD comprende una alanina en la posición 49 (A49).

30 En un aspecto preferido, el agente de unión a TNF de la divulgación tal como un ISVD comprende una serina en la posición 74 (S74).

35 En un aspecto preferido adicional, el agente de unión a TNF de la divulgación tal como un ISVD comprende una asparagina en la posición 73 (N73) y o una lisina en la posición 75 (K75).

40 Tal como se mencionó, en la divulgación, se prefieren particularmente secuencias de aminoácidos en las que la posición 89 es T o en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L (opcionalmente en combinación adecuada con una mutación 110K o 110Q y/o una mutación 112K o 112Q, y en particular en combinación con una mutación 110K o 110Q). Incluso se prefieren más secuencias de aminoácidos en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L, opcionalmente con una mutación 110K o 110Q.

Por tanto, en un aspecto preferido, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

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

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

50 - una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4);

y que tiene:

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

y/o

60 - no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

65

y que tiene opcionalmente:

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

en el que:

- 10 - el residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V; y
- el residuo de aminoácido en la posición 89 es T; y
- 15 - el residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, K o Q (y es preferiblemente T); y
- el residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de manera adecuada de S, K o Q (y es preferiblemente S).

20 En otro aspecto preferido, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

- una CDR1 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 2); y
- 25 - una CDR2 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 3); y
- una CDR3 (según Kabat) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4);

y que tiene:

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

35 y/o

- no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en
- 40 cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

y que tiene opcionalmente:

- 45 - una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 ó 5 (y preferiblemente 1 ó 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente que se produce de manera natural) que se elige independientemente, y se elige preferiblemente de manera independiente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I);
- 50

en el que:

- el residuo de aminoácido en la posición 11 es V; y
- 55 - el residuo de aminoácido en la posición 89 es L; y
- el residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, K o Q; y
- el residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de manera adecuada de S, K o Q.
- 60

En un aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 65 - 11V en combinación con 89L; o

- 11V en combinación con 110K o 110Q;

- 11V en combinación con 112K o 112Q;

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

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

10 y tienen CDR (según Kabat) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

15 - 89L en combinación con 11V; o

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

20 - 89L en combinación con 112K o 112Q; o

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

25 - 89L en combinación con 11V y 112K o 112Q;

y tienen CDR (según Kabat) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

30 En otro aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

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

35 - 110K o 110Q en combinación con 89L; o

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

40 y tienen CDR (según Kabat) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

45 - 112K o 112Q en combinación con 11V; o

- 112K o 112Q en combinación con 89L; o

50 - 112K o 112Q en combinación con 11V y 89L;

y tienen CDR (según Kabat) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

55 En otro aspecto, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden a T en la posición 89 y tienen CDR (según Kabat) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

60 En otro aspecto, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden una V en la posición 11 y una L en la posición 89 y tienen CDR (según Kabat) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

65 Tal como se mencionó, los agentes de unión a TNF de la divulgación según los aspectos anteriores son preferiblemente además tales que contienen una combinación adecuada de una mutación S49A, A74S y/o L78V, y preferiblemente una combinación adecuada de dos cualesquiera de estas mutaciones, tal como las tres de estas mutaciones (y de nuevo, cuando el agente de unión a TNF es monovalente o está presente en el extremo N-terminal

de un compuesto o polipéptido de la divulgación, también preferiblemente una mutación E1D).

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

- 5 - una CDR1 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y
 - una CDR2 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y
 - una CDR3 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4);

10 y que tiene:

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

y/o

- 20 - no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

25 y que tiene opcionalmente:

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

35 en el que:

- el residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V; y
 - el residuo de aminoácido en la posición 89 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, V o L; y
 40 - el residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, K o Q; y
 - el residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de manera adecuada de S, K o Q;

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

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

- 50 - una CDR1 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y
 - una CDR2 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y
 55 - una CDR3 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4);

y que tiene:

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

y/o

- 65 - no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de

aminoácidos" (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

y que tiene opcionalmente:

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

dominio variable individual de inmunoglobulina que comprende los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 89T; o

- 89L en combinación con 11V; o

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

- 89L en combinación con 112K o 112Q; o

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

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

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

- 11V en combinación con 112K o 112Q.

Tal como se mencionó, cuando se usa un agente de unión a TNF de la invención en un formato monovalente y/o está presente en el extremo C-terminal de un compuesto de la divulgación (tal como se define en el presente documento), el agente de unión a TNF (y por consiguiente, el compuesto de la divulgación resultante) tiene preferiblemente una extensión C-terminal X_(n), extensión C-terminal que puede ser tal como se describe en el presente documento para los agentes de unión a TNF de la invención y/o tal como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325.

Tal como se mencionó, en la divulgación, se prefieren particularmente secuencias de aminoácidos en las que la posición 89 es T o en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L (opcionalmente en combinación adecuada con una mutación 110K o 110Q y/o una mutación 112K o 112Q, y en particular en combinación con una mutación 110K o 110Q). Incluso se prefieren más secuencias de aminoácidos en las que la posición 11 es V y la posición 89 es L, opcionalmente con una mutación 110K o 110Q.

Por tanto, en un aspecto preferido, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

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

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

- una CDR3 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4);

y que tiene:

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

y/o

- no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 "diferencias de aminoácidos" (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones

enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

5 y que tiene opcionalmente:

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

en el que:

- 15 - el residuo de aminoácido en la posición 11 se elige preferiblemente de L o V; y
- el residuo de aminoácido en la posición 89 es T; y
- 20 - el residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, K o Q (y es preferiblemente T); y
- el residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de manera adecuada de S, K o Q (y es preferiblemente S).

25 En otro aspecto preferido, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que tiene:

- una CDR1 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos GFTFSTADMG (SEQ ID NO: 5); y
- 30 - una CDR2 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTY (SEQ ID NO: 6); y
- una CDR3 (según Abm) que es la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 4);

y que tiene:

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

40 y/o

- no más de 7, tal como no más de 5, preferiblemente no más de 3, tal como sólo 3, 2 ó 1 “diferencias de aminoácidos” (tal como se definen en el presente documento, y sin tener en cuenta ninguna de las mutaciones enumeradas anteriormente en la(s) posición/posiciones 11, 89, 110 ó 112 que puedan estar presentes y sin tener en cuenta ninguna extensión C-terminal que pueda estar presente) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (en la que dichas diferencias de aminoácidos, si están presentes, pueden estar presentes en las regiones de entramado y/o las CDR pero están presentes preferiblemente sólo en las regiones de entramado y no en las CDR);

50 y que tiene opcionalmente:

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

55 en el que:

- el residuo de aminoácido en la posición 11 es V; y
- 60 - el residuo de aminoácido en la posición 89 es L; y
- el residuo de aminoácido en la posición 110 se elige preferiblemente de manera adecuada de T, K o Q; y
- el residuo de aminoácido en la posición 112 se elige preferiblemente de manera adecuada de S, K o Q.

65 En un aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los

siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

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

15 y tienen CDR (según Abm) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 20
- 89L en combinación con 11V; o
 - 89L en combinación con 110K o 110Q; o
- 25
- 89L en combinación con 112K o 112Q; o
 - 89L en combinación con 11V y 110K o 110Q; o
 - 89L en combinación con 11V y 112K o 112Q;
- 30

y tienen CDR (según Abm) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 35
- 110K o 110Q en combinación con 11V; o
- 40
- 110K o 110Q en combinación con 89L; o
 - 110K o 110Q en combinación con 11V y 89L;

45 y tienen CDR (según Abm) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto específico, pero no limitativo, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden los siguientes residuos de aminoácido (es decir, mutaciones en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1) en las posiciones mencionadas (numeración según Kabat):

- 50
- 112K o 112Q en combinación con 11V; o
 - 112K o 112Q en combinación con 89L; o
- 55
- 112K o 112Q en combinación con 11V y 89L;

y tienen CDR (según Abm) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

60 En otro aspecto, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden a T en la posición 89 y tienen CDR (según Abm) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

65 En otro aspecto, los agentes de unión a TNF de la divulgación comprenden una V en la posición 11 y una L en la posición 89 y tienen CDR (según Abm) y tienen un grado global de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que son tal como se describe en el presente documento.

Tal como se mencionó, los agentes de unión a TNF de la divulgación según los aspectos anteriores son preferiblemente además tales que contienen una combinación adecuada de una mutación S49A, A74S y/o L78V, y preferiblemente una combinación adecuada de dos cualesquiera de estas mutaciones, tal como las tres de estas mutaciones (y de nuevo, cuando el agente de unión a TNF es monovalente o está presente en el extremo N-terminal de un compuesto o polipéptido de la invención, preferiblemente también una mutación E1D).

La invención se refiere a un agente de unión a TNF tal como se define en la reivindicación adjunta, y en particular a un agente de unión a TNF que está en un formato monovalente y que tiene una D en la posición 1 (y/o una mutación E1D) y una extensión C-terminal $X_{(n)}$ tal como se define en la reivindicación adjunta (tal como un residuo de alanina C-terminal).

En otro aspecto específico, pero no limitativo, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que es o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos elegida de una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68.

En otro aspecto específico, pero no limitativo, la divulgación se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina que es o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos elegida de una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68.

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

Para los fines de la invención, el "tracto gastrointestinal", o "tracto GI" se entiende que incluye el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), el intestino grueso (ciego, colon, recto) y el ano. El término "digestión gástrica" tal como se usa en el presente documento se entiende que describe la digestión en el estómago, el intestino delgado y/o el intestino grueso.

El término "degradación gástrica" de un anticuerpo se usa en el presente documento para referirse a la degradación de un ISVD, compuesto o polipéptido de la invención en el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso mediante enzimas endógenas o exógenas presentes en el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o debido a la exposición a condiciones ácidas durante la digestión gástrica.

El término "ISVD estabilizado", "compuestos estabilizados" y "polipéptidos estabilizados" tal como se usa en el presente documento se entiende que describe un ISVD, compuesto o polipéptido, respectivamente que se ha modificado mediante ingeniería genética para hacerlo más estable frente a la degradación en el tracto digestivo cuando se administra por vía tópica. En comparación con un ISVD, compuesto o polipéptido que no se ha procesado o modificado mediante ingeniería genética según la invención, un ISVD, compuesto o polipéptido estabilizado que se modifica mediante ingeniería genética según la invención se degrada más lentamente o en un menor grado por la digestión gástrica, tal como digestión mediante enzimas endógenas o exógenas presentes en el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso y/o por las condiciones ácidas presentes en el estómago. "ISVD estabilizados", "compuestos estabilizados" y "polipéptidos estabilizados" también se denominan "ISVD con estabilidad potenciada frente a la degradación en el tracto GI", "compuestos con estabilidad potenciada frente a la degradación en el tracto GI" y "polipéptidos con estabilidad potenciada frente a la degradación en el tracto GI", respectivamente.

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

Pueden generarse ISVD, compuestos y polipéptidos estabilizados mediante la mutación de uno o más residuos de aminoácido que son susceptibles a la degradación gástrica para dar residuos de aminoácido que son resistentes a la degradación gástrica. Pueden generarse ISVD, compuestos y polipéptidos estabilizados mediante la mutación de múltiples restos de residuos de aminoácido que aumentan la estabilidad frente a la degradación gástrica.

Por tanto, la presente divulgación se refiere a la identificación de residuos de aminoácido que confieren estabilidad del agente de unión a TNF de la invención, y que potencian la estabilidad del agente de unión a TNF. Preferiblemente, el agente de unión a TNF se hace más resistente a la degradación gástrica por una o más de las condiciones de bajo pH o las actividades de una o más de proteasas tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, y/o proteasas derivadas de bacterias.

En una realización la divulgación se refiere a un método de identificación de un residuo de aminoácido que confiere estabilidad de un ISVD, compuesto o polipéptido frente a la degradación gástrica que comprende las etapas de: (a) degradar un ISVD, compuesto o polipéptido mediante una o más proteasas para dar fragmentos; y (b) analizar los fragmentos de la etapa (a) mediante medios adecuados, tales como por ejemplo CL-EM; identificando de ese modo el/los residuo(s) de aminoácido(s) que confiere(n) estabilidad de un ISVD, compuesto o polipéptido frente a la degradación gástrica.

En una realización la divulgación se refiere a un método de potenciación de la estabilidad de un ISVD, compuesto o polipéptido frente a la degradación gástrica que comprende las etapas (a) y (b) anteriores, seguido por: (c) mutar el/los residuo(s) de aminoácido(s) que confiere(n) estabilidad de un ISVD, compuesto o polipéptido frente a la degradación gástrica; y (d) repetir las etapas (a) y (b) de antes; por lo cual la ausencia de uno o más fragmentos indica una estabilidad potenciada del ISVD, compuesto o polipéptido frente a la degradación gástrica.

En la presente memoria descriptiva:

- el término "dominio variable individual de inmunoglobulina" (también denominado "ISV" o ISVD") se usa generalmente para referirse a dominios variables de inmunoglobulina (que pueden ser dominios de cadena pesada o de cadena ligera, incluyendo dominios VH, VHH o VL) que pueden formar un sitio de unión a antígeno funcional sin interacción con otro dominio variable (por ejemplo sin una interacción VH/VL tal como se requiere entre los dominios VH y VL de un anticuerpo monoclonal de 4 cadenas convencional). Los ejemplos de ISVD estarán claros para el experto y, por ejemplo, incluyen Nanobodies (incluyendo un VHH, un VHH humanizado y/o VH camelizados tales como VH humanos camelizados), IgNAR, dominios, anticuerpos (de un único dominio) (tales como dAb™) que son dominios VH o que se derivan de un dominio VH y anticuerpos (de un único dominio) (tales como dAb™) que son dominios VL o que se derivan de un dominio VL. A menos que se mencione explícitamente lo contrario en el presente documento, se prefieren generalmente los ISVD que se basan en y/o se derivaban de dominios variables de cadena pesada (tales como dominios VH o VHH). Lo más preferiblemente, a menos que se indique explícitamente lo contrario en el presente documento, un ISVD será un Nanobody.

- El término "Nanobody" es generalmente tal como se define en el documento WO 2008/020079 o el documento WO 2009/138519, y por tanto en un aspecto específico indica generalmente un VHH, un VHH humanizado o un VH camelizado (tal como un VH humano camelizado) o generalmente un VHH de secuencia optimizada (tal como por ejemplo optimizada para lograr estabilidad química y/o solubilidad, solapamiento máximo con regiones de entramado humanas conocidas y expresión máxima). Se indica que los términos Nanobody o Nanobodies son marcas registradas de Ablynx N.V. y por tanto también pueden denominarse Nanobody® y/o Nanobodies®;

- generalmente, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, los ISVD, Nanobodies, polipéptidos, proteínas y otros compuestos y constructos a los que se hace referencia en el presente documento se destinarán para su uso en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades o trastornos en el hombre (y/o opcionalmente también en animales de sangre caliente y en particular mamíferos). Por tanto, generalmente, los ISVD, Nanobodies, polipéptidos, proteínas y otros compuestos y constructos descritos en el presente documento son preferiblemente tales que pueden usarse como, y/o pueden ser adecuadamente una parte de, un fármaco (biológico) u otro compuesto farmacéuticamente o terapéuticamente activo y/o de un producto o composición farmacéutica. Un fármaco, compuesto o producto de este tipo es preferiblemente tal que es adecuado para su administración a un ser humano, por ejemplo para la profilaxis o el tratamiento de un sujeto que necesita tal profilaxis o tratamiento o por ejemplo como parte de un ensayo clínico. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, para este fin, un fármaco o compuesto de este tipo puede contener otros restos, entidades o unidades de unión además de los ISVD proporcionados por la invención (que, tal como también se describe en el presente documento, pueden por ejemplo ser uno o más de otros restos terapéuticos adicionales y/o uno o más de otros restos que influyen en las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del producto biológico a base de ISVD o a base de Nanobody, tal como su semivida). Los ejemplos adecuados de tales restos terapéuticos u otros adicionales estarán claros para el experto, y por ejemplo pueden incluir generalmente cualquier proteína, polipéptido u otro dominio de unión o unidad de unión terapéuticamente activa, así como por ejemplo modificaciones tales como las descritas en las páginas 149 a 152 del documento WO 2009/138159. Un producto biológico a base de ISVD o producto biológico a base de Nanobody es preferiblemente un producto terapéutico o está destinado para su uso como producto terapéutico (que incluye profilaxis y diagnóstico) y para este fin contiene preferiblemente al menos un ISVD contra una diana terapéuticamente relevante (tal como por ejemplo RANK-L, vWF, IgE, RSV, CXCR4, IL-23 u otras interleucinas, etc.). Para algunos ejemplos específicos, pero no limitativos de tales productos biológicos a base de ISVD o a base de Nanobody, se hace referencia a los ejemplos 8 a 18 y también por ejemplo a las diversas solicitudes de Ablynx N.V. (tal como por ejemplo y sin limitación los documentos WO 2004/062551, WO 2006/122825, WO 2008/020079 y

WO 2009/068627), así como por ejemplo (y sin limitación) a solicitudes tales como los documentos WO 2006/038027, WO 2006/059108, WO 2007/063308, WO 2007/063311, WO 2007/066016 y WO 2007/085814. Además, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el resto adicional puede ser un ISVD o Nanobody tal como se describe en el presente documento dirigido contra una proteína sérica (humana) tal como albúmina sérica (humana), y un ISVD o Nanobody de este tipo también puede tener usos terapéuticos, en particular en y/o para prolongar la semivida de los agentes de unión a TNF descritos en el presente documento. Se hace referencia por ejemplo a los documentos WO 2004/041865, WO 2006/122787 y WO 2012/175400, que describen generalmente el uso de Nanobodies de unión a albúmina sérica para la prolongación de la semivida. Además, en la presente memoria descriptiva, a menos que se mencione explícitamente lo contrario en el presente documento, todos los términos mencionados en el presente documento tienen el significado facilitado en el documento WO 2009/138519 (o en la técnica anterior citada en el documento WO 2009/138519) o el documento WO 2008/020079 (o en la técnica anterior citada en WO 2008/020079). Además, cuando no se describe específicamente un método o técnica en el presente documento, puede realizarse tal como se describe en el documento WO 2009/138519 (o en la técnica anterior citada en el documento WO 2009/138519) o el documento WO 2008/020079 (o en la técnica anterior citada en el documento WO 2008/020079). Además, tal como se describe en el presente documento, cualquier producto o composición farmacéutica que comprende cualquier ISVD o compuesto de la invención también puede comprender uno o más componentes adicionales conocidos *per se* para su uso en productos o composiciones farmacéuticas (es decir, dependiendo de la forma farmacéutica prevista) y/o por ejemplo uno o más de otros compuestos o principios activos destinados para uso terapéutico (es decir, para proporcionar un producto de combinación).

Además, cuando se usan en la presente memoria descriptiva o reivindicaciones, los siguientes términos tienen el mismo significado que se facilita en, y/o cuando sea aplicable puede determinarse de la manera descrita en, las páginas 62-75 del documento WO 2009/138519: “agonista”, “antagonista”, “agonista inverso”, “residuo de aminoácido apolar, no cargado”, “residuo de aminoácido polar, no cargado”, “residuo de aminoácido polar, cargado”, “identidad de secuencia”, “exactamente igual” y “diferencia de aminoácido” (cuando se hace referencia a una comparación de secuencia de dos secuencias de aminoácidos), “(en) (forma) esencialmente aislada”, “dominio”, “dominio de unión”, “determinante antigénico”, “epítipo”, “contra” o “dirigido contra” (un antígeno), “especificidad” y “semivida”. Además, los términos “que modula” y “modular”, “sitio de interacción”, “específico para”, “bloqueo cruzado”, “bloqueo de manera cruzada” y “que bloquea de manera cruzada” y “esencialmente independiente del pH” son tal como se definen en (y/o pueden determinarse tal como se describe en) las páginas 74-79 del documento WO 2010/130832 de Ablynx N.V. Además, cuando se hace referencia a un constructo, compuesto, proteína o polipéptido de la invención, términos como “monovalente”, “bivalente” (o “multivalente”), “biespecífico” (o “multiespecífico”), y “biparatópico” (o “multiparatópico”) pueden tener el significado facilitado en los documentos WO 2009/138519, WO 2010/130832 o WO 2008/020079.

El término “semivida” tal como se usa en este caso en relación con un ISVD, Nanobody, producto biológico a base de ISVD, producto biológico a base de Nanobody o cualquier otra secuencia de aminoácidos, compuesto o polipéptido a los que se hace referencia en el presente documento puede definirse generalmente tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079 y tal como se menciona allí se refiere al tiempo que tarda la concentración sérica de la secuencia de aminoácidos, compuesto o polipéptido en reducirse en el 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a degradación de la secuencia o compuesto y/o aclaramiento o secuestro de la secuencia o compuesto mediante mecanismos naturales. La semivida *in vivo* de una secuencia de aminoácidos, compuesto o polipéptido de la invención puede determinarse de cualquier manera conocida *per se*, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas estarán claras para el experto en la técnica, y pueden ser por ejemplo generalmente tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079. Tal como también se menciona en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079, la semivida puede expresarse usando parámetros tales como la t_{1/2}-alfa, t_{1/2}-beta y el área bajo la curva (AUC). En este sentido debe indicarse que el término “semivida” tal como se usa en el presente documento se refiere en particular a la t_{1/2}-beta o semivida terminal (en la que la t_{1/2}-alfa y/o el AUC o ambos pueden mantenerse fuera de consideraciones). Se hace referencia por ejemplo a la parte experimental más adelante, así como a los manuales convencionales, tales como Kennet, A *et al*: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y Peters *et al*, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a “Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición rev. (1982). De manera similar, los términos “aumento en la semivida” o “semivida aumentada” son también tal como se definen en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 2008/020079 y en particular se refieren a un aumento en la t_{1/2}-beta, o bien con o bien sin un aumento en la t_{1/2}-alfa y/o la AUC o ambos.

Por consiguiente, en un aspecto la presente divulgación se refiere a un compuesto tal como se describe en el presente documento, en el que dicho compuesto comprende además un resto de unión a proteína sérica.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un compuesto tal como se describe en el presente documento, en el que dicho resto de unión a proteína sérica se une a albúmina sérica.

Cuando un término no se define específicamente en el presente documento, tiene su significado habitual en la técnica, que estará claro para el experto. Se hace referencia por ejemplo a los manuales convencionales, tales como

Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old *et al.*, "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6ª ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt *et al.*, Roitt's Essential Immunology, 10ª ed. Blackwell Publishing, R.U. (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica anterior general citada en el presente documento.

Además, tal como ya se indica en el presente documento, los residuos de aminoácido de un Nanobody se numeran según la numeración general para VH facilitada por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), tal como se aplica a dominios VHH de camélidos en el artículo de Riechmann y Muildermans, J. Immunol. Methods 23 de junio de 2000; 240 (1-2): 185-195; o a los que se hace referencia en el presente documento. Según esta numeración, FR1 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 1-30, CDR1 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-35, FR2 de un Nanobody comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, FR3 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 66-94, CDR3 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102, y FR4 de un Nanobody comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 103-113. [En este sentido, debe indicarse que, tal como se conoce bien en la técnica para dominios VH y para dominios VHH, el número total de residuos de aminoácido en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácido indicado por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácido que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácido en la secuencia real. Generalmente, sin embargo, puede decirse que, según la numeración de Kabat e independientemente del número de residuos de aminoácido en las CDR, la posición 1 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR1 y viceversa, la posición 36 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR2 y viceversa, la posición 66 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR3 y viceversa, y la posición 103 según la numeración de Kabat corresponde al inicio de FR4 y viceversa.]

Métodos alternativos para la numeración de los residuos de aminoácido de dominios VH, métodos que también pueden aplicarse de manera análoga a dominios VHH de camélidos y a Nanobodies, son el método descrito por Chothia *et al.* (Nature 342, 877-883 (1989)), la denominada "definición de AbM" y la denominada "definición de contacto". Sin embargo, en la presente descripción, aspectos y figuras, se seguirá la numeración según Kabat tal como se aplica a dominios VHH por Riechmann y Muildermans, a menos que se indique lo contrario.

Debe indicarse también que las figuras, cualquier lista de secuencias y la parte experimental/ejemplos sólo se facilitan para ilustrar adicionalmente la invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención y/o de la reivindicación adjunta de ningún modo, a menos que se indique explícitamente lo contrario en el presente documento.

La divulgación también se refiere a proteínas, polipéptidos y otros constructos, moléculas o entidades químicas que comprenden o consisten esencialmente en los agentes de unión a TNF de la invención tal como se describe en el presente documento (es decir, que comprenden o consisten esencialmente en uno o más de tales agentes de unión a TNF, tales como uno, dos o tres de tales agentes de unión a TNF); a métodos para expresar/producir los agentes de unión a TNF de la invención y/o para expresar/producir proteínas, polipéptidos y otros constructos, moléculas o entidades químicas que comprenden los mismos; a composiciones y productos (tales como composiciones y productos farmacéuticos) que comprenden los agentes de unión a TNF de la invención y/o proteínas, polipéptidos y otros constructos, moléculas o entidades químicas que comprenden los mismos; a secuencia de nucleótidos y ácidos nucleicos que codifican para los agentes de unión a TNF de la invención y/o que codifican para proteínas o polipéptidos que comprenden los mismos; y a usos (y en particular usos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico) de los agentes de unión a TNF de la invención y de proteínas, polipéptidos y otros constructos, moléculas o entidades químicas que comprenden los mismos.

Estos y otros aspectos, realizaciones, ventajas, aplicaciones y usos de la divulgación quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a proteínas (tales como proteínas de fusión), polipéptidos, constructos, compuestos u otras entidades químicas que comprenden o consisten esencialmente en al menos un (tal como uno, dos o tres) agente de unión a TNF de la invención (también denominado colectivamente en el presente documento "compuestos de la divulgación", "polipéptidos de la divulgación", "constructos de la divulgación" o "proteínas de fusión de la divulgación"). Por tanto, el compuesto de la divulgación puede ser un polipéptido.

Tales compuestos de la divulgación, además del uno o más agentes de unión a TNF de la invención, pueden

contener adicionalmente una o más de otras secuencias de aminoácidos, entidades químicas o restos. Estas otras secuencias de aminoácidos, entidades químicas o restos pueden conferir una o más propiedades deseadas al compuesto (resultante) de la divulgación y/o pueden alterar las propiedades del compuesto (resultante) de la divulgación de una manera deseada, por ejemplo para dotar al compuesto (resultante) de la divulgación de una actividad biológica y/o terapéutica deseada (por ejemplo, para dotar al compuesto de la divulgación resultante de afinidad y preferiblemente potencia contra otra diana terapéuticamente relevante de manera que el compuesto resultante se vuelve "bienespecífico" con respecto a TNF y a otra diana terapéuticamente relevante), para proporcionar una semivida deseada y/o para modificar o mejorar (de otro modo) las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas, para dirigir el compuesto de la divulgación a células, tejidos u órganos específicos (incluyendo células cancerosas y tejidos cancerosos), para proporcionar un efecto citotóxico y/o para servir como etiqueta o marcador detectable. Algunos ejemplos no limitativos de tales otras secuencias de aminoácidos, entidades químicas o restos son:

- uno o más ligadores adecuados (tal como un ligador 9GS, 15GS o 35GS); y/o

- uno o más dominios de unión o unidades de unión que se dirigen contra una diana terapéuticamente relevante distinta de TNF (es decir, para proporcionar un compuesto de la invención que es bienespecífico tanto para TNF como para la otra diana terapéuticamente relevante); y/o

- uno o más dominios de unión o unidades de unión que proporcionan un aumento en la semivida (por ejemplo, un dominio de unión o unidad de unión que puede unirse a una proteína sérica tal como albúmina sérica); y/o

- uno o más dominios de unión o unidades de unión que dirigen el compuesto de la divulgación a una célula, tejido u órgano deseado (tal como una célula cancerosa); y/o

- uno o más dominios de unión o unidades de unión que proporcionan especificidad aumentada contra TNF (habitualmente, serán capaces de unirse a TNF pero generalmente por sí mismos no serán esencialmente funcionales contra TNF); y/o

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

- un resto que mejora la semivida tal como un grupo polietilenglicol adecuado (es decir PEGilación) o una secuencia de aminoácidos que proporciona semivida aumentada tal como albúmina sérica humana o un fragmento adecuado de la misma (es decir, fusión con albúmina) o por ejemplo un péptido de unión a albúmina sérica tal como se describe en el documento WO 2008/068280; y/o

- una carga útil tal como un carga útil citotóxica; y/o

- un marcador o etiqueta detectable, tal como un radiomarcador o marcador fluorescente; y/o

- una etiqueta que puede ayudar a la inmovilización, detección y/o purificación del compuesto de la divulgación, tal como una etiqueta HIS o FLAG3; y/o

- una etiqueta que puede funcionalizarse, tal como una etiqueta GGC o GGCC C-terminal; y/o

- una extensión C-terminal $X_{(n)}$, que puede ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento para los agentes de unión a TNF de la invención y/o tal como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325.

Aunque habitualmente menos preferido, tampoco se excluye que los compuestos de la divulgación puedan contener también una o más partes o fragmentos de un anticuerpo convencional (preferiblemente humano) (tal como una parte Fc o un fragmento funcional del mismo o uno o más dominios constantes) y/o de un anticuerpo sólo de cadena pesada de camélido (tal como uno o más dominios constantes).

En un aspecto particular, la presente divulgación se refiere a un constructo que comprende o consiste esencialmente en un ISVD tal como se define en el presente documento o un compuesto tal como se define en el presente documento, y que comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, unidos opcionalmente mediante uno o más ligadores peptídicos.

En un aspecto particular adicional, la presente divulgación se refiere a un constructo tal como se define en el presente documento, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión se eligen del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una porción Fc, y pequeñas proteínas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas.

5 Cuando los compuestos de la divulgación contienen uno o más dominios de unión o unidades de unión adicionales (por ejemplo un dominio de unión o unidad de unión esencialmente no funcional adicional contra TNF que proporciona especificidad aumentada contra TNF, un dominio de unión o unidad de unión contra una diana terapéutica distinta de TNF, un dominio de unión o unidad de unión contra una diana tal como albúmina sérica humana que proporciona semivida aumentada, y/o un dominio de unión o unidad de unión que dirige el compuesto de la divulgación a una célula, tejido u órgano específico y/o que permite que el compuesto de la divulgación se internalice en una célula), estos otros dominios de unión o unidades de unión comprenden preferiblemente uno o más ISVD, y más preferiblemente son todos ISVD. Por ejemplo y sin limitación, estos uno o más dominios de unión o unidades de unión adicionales pueden ser uno o más Nanobodies (incluyendo un VHH, un VHH humanizado y/o un VH camelizado tal como VH camelizados humanos), un anticuerpo de (un único dominio) que es un dominio VH o que se deriva de un dominio VH, un dAb que es o consiste esencialmente en un dominio VH o que se deriva de un dominio VH, o incluso un anticuerpo de (un único) dominio o un dAb que es o consiste esencialmente en un dominio VL. En particular, estos uno o más dominios de unión o unidades de unión, cuando están presentes, pueden comprender uno o más Nanobodies, y más en particular son todos Nanobodies.

20 Cuando un compuesto de la divulgación tiene un ISVD en su extremo C-terminal (ISVD C-terminal que puede ser un agente de unión a TNF de la invención o puede ser por ejemplo, si está presente en el compuesto de la invención, un ISVD esencialmente no funcional adicional contra TNF que proporciona especificidad aumentada contra TNF, un ISVD contra una diana terapéutica distinta de TNF, un ISVD contra una diana tal como albúmina sérica humana que proporciona semivida aumentada, o un ISVD que dirige el compuesto de la divulgación a una célula, tejido u órgano específico y/o que permite que el compuesto de la divulgación se internalice en una célula), entonces el compuesto de la divulgación (es decir dicho ISVD C-terminal) tiene preferiblemente una extensión C-terminal $X_{(n)}$, extensión C-terminal que puede ser tal como se describe en el presente documento para los agentes de unión a TNF de la divulgación y/o tal como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325.

30 Cuando un compuesto de la divulgación contiene, además del uno o más agentes de unión a TNF de la invención, cualquier ISVD adicional (uno o más ISVD adicionales que pueden ser, tal como se mencionó, un ISVD esencialmente no funcional adicional contra TNF que proporciona especificidad aumentada contra TNF, un ISVD contra una diana terapéutica distinta de TNF, un ISVD contra una diana tal como albúmina sérica humana que proporciona semivida aumentada, y/o un ISVD que dirige el compuesto de la divulgación a una célula, tejido u órgano específico y/o que permite que el compuesto de la divulgación se internalice en una célula), y cuando tales ISVD adicionales son Nanobodies o son ISVD que son, que consisten esencialmente en y/o que se derivan de secuencias de VH, entonces según un aspecto preferido de la divulgación dicho uno o más (y preferiblemente todos) ISVD adicionales presentes en el compuesto de la divulgación contendrán dentro de su secuencia una o más mutaciones de región de entramado que reducen la unión de anticuerpos preexistentes. En particular, según este aspecto de la divulgación, tales ISVD adicionales pueden contener (una combinación adecuada de) residuos de aminoácido/mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 que son tal como se describe en el documento WO2015/173325 y/o que son esencialmente tal como se describe en el presente documento para los agentes de unión a TNF de la invención. En un aspecto específico, cuando el compuesto de la divulgación tiene un ISVD de este tipo en su extremo C-terminal (es decir, no tiene agente de unión a TNF de la invención en su extremo C-terminal), entonces al menos dicho ISVD que está presente en y/o forma el extremo C-terminal tiene tales mutaciones de región de entramado que reducen la unión de anticuerpos preexistentes (y dicho ISVD C-terminal también tendrá preferiblemente una extensión C-terminal $X_{(n)}$ tal como se describe en el presente documento).

45 Tal como se mencionó, cuando el compuesto de la divulgación va a tener una semivida aumentada (es decir, en comparación con el agente de unión a TNF monovalente de la invención), el compuesto de la divulgación contiene preferiblemente al menos un ISVD (tal como uno) (y en particular Nanobody) que proporciona tal semivida aumentada. Un ISVD de este tipo se dirigirá habitualmente contra una proteína sérica adecuada tal como transferrina y en particular contra albúmina sérica (humana). En particular, un ISVD o Nanobody de este tipo puede ser un anticuerpo de (un único) dominio o dAb contra albúmina sérica humana tal como se describe en por ejemplo los documentos EP 2 139 918, WO 2011/006915, WO 2012/175400, WO 2014/111550 y puede ser en particular un Nanobody de unión a albúmina sérica tal como se describe en los documentos WO 2004/041865, WO 2006/122787, WO 2012/175400 o WO2015/173325. ISVD que se unen a albúmina sérica particularmente preferidos son los Nanobody Alb-1 (véase el documento WO 2006/122787) o sus variantes humanizadas tales como Alb-8 (documento WO 2006/122787, SEQ ID NO: 62), Alb-23 (documento WO 2012/175400, SEQ ID NO: 1) y otras variantes humanizadas (y preferiblemente también de secuencia optimizada) de Alb-1 y/o variantes de Alb-8 o Alb-23 (o más generalmente ISVD que tienen esencialmente las mismas CDR que Alb-1, Alb-8 y Alb-23).

60 De nuevo, tal como se mencionó, un ISVD que se une a albúmina sérica, cuando está presente, puede contener dentro de su secuencia una o más mutaciones de región de entramado que reducen la unión de anticuerpos preexistentes. En particular, cuando un ISVD que se une a albúmina sérica es un Nanobody o un anticuerpo de (un único) dominio que es, consiste esencialmente en y/o se deriva de un dominio VH, el ISVD que se une a albúmina sérica puede contener (una combinación adecuada de) residuos de aminoácido/mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 que son tal como se describe en el documento WO2015/173325 y/o que son esencialmente tal como se describe en el presente documento para los agentes de unión a TNF de la invención. Por ejemplo, el documento

WO2015/173325 describe varias variantes de Alb-1, Alb-8 y Alb-23 que contienen residuos de aminoácido/mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 que reducen la unión de anticuerpos preexistentes que pueden usarse en los compuestos de la divulgación.

5 En un aspecto particular pero no limitativo de la divulgación, la invención proporciona un compuesto de la divulgación, tal como un polipéptido de la divulgación, que comprende además del uno o más elementos estructurales, por ejemplo ISVD, que se unen a TNF, al menos un elemento estructural que se une a albúmina sérica, tal como un ISVD que se une a albúmina sérica, preferiblemente que se une a albúmina sérica humana tal como se describe en el presente documento, en el que dicho ISVD que se une a albúmina sérica consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en las que CDR1 es SFGMS, CDR2 es SISGSGSDTLYADSVKG y CDR3 es GGSLSR. Preferiblemente, dicho ISVD que se une a albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en Alb8, Alb23, Alb129, Alb132, Alb11, Alb11 (S112K)-A, Alb82, Alb82-A, Alb82-AA, Alb82-AAA, Alb82-G, Alb82-GG, Alb82-GGG, Alb92 o Alb223 (véase la tabla D).

15 De nuevo, cuando un ISVD que se une a albúmina sérica está presente en el extremo C-terminal de un compuesto de la divulgación, el ISVD que se une a albúmina sérica (y como resultado, el compuesto de la invención) tiene preferiblemente una extensión C-terminal $X_{(n)}$, extensión C-terminal que puede ser tal como se describe en el presente documento para los agentes de unión a TNF de la invención y/o tal como se describe en los documentos WO 2012/175741 o WO2015/173325. También tiene preferiblemente mutaciones que reducen la unión de anticuerpos preexistentes, como (una combinación adecuada de) los residuos de aminoácido/mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 descritos en el documento WO2015/173325.

20 Sin embargo, tal como se mencionó, otros medios para aumentar la semivida de un compuesto de la divulgación (tales como PEGilación, fusión a albúmina humana o un fragmento adecuada de la misma, o el uso de un péptido de unión a albúmina sérica adecuado), aunque menos preferidos, también se incluyen en el alcance de la invención.

25 Por consiguiente, en una realización la presente divulgación se refiere a un compuesto tal como se describe en el presente documento, en el que dicho resto de unión a proteína sérica es un polipéptido no basado en anticuerpo.

30 En una realización adicional la presente divulgación se refiere a un compuesto tal como se describe en el presente documento, que comprende además PEG.

35 Generalmente, cuando un compuesto de la divulgación tiene semivida aumentada (por ejemplo a través de la presencia de un ISVD que aumenta la semivida o cualquier otro modo adecuado de aumentar la semivida), el compuesto de la divulgación resultante tiene preferiblemente una semivida (tal como se define en el presente documento) que es al menos 2 veces, preferiblemente al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida del agente de unión a TNF monovalente de la invención (tal como se mide en o bien el hombre y/o bien un modelo animal adecuado, tal como ratón o macaco cangrejero). En particular, un compuesto de la divulgación tiene preferiblemente una semivida (tal como se define en el presente documento) en sujetos humanos de al menos 1 día, preferiblemente al menos 3 días, más preferiblemente al menos 7 días, tal como al menos 10 días.

40 Quedará claro a partir de la divulgación en el presente documento que los compuestos de la divulgación que se basan en uno o más ISVD pueden tener diferentes "formatos", por ejemplo pueden ser esencialmente monovalentes, bivalentes o trivalentes, pueden ser mono-específicos, bio-específicos, tri-específicos etc., y pueden ser biparatópicos (tal como se define en el presente documento y en por ejemplo el documento WO 2009/068625). Por ejemplo, un compuesto de la divulgación puede ser:

45 - (esencialmente) monovalente, es decir, que comprende (esencialmente) un único agente de unión a TNF de la invención. Tal como se mencionó, cuando se usa en formato monovalente, un agente de unión a TNF de la invención tiene preferiblemente una extensión C-terminal $X_{(n)}$ tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Un compuesto de la invención de este tipo también puede tener semivida prolongada;

50 - (esencialmente) bivalente o trivalente y mono-específico. Un compuesto de la invención de este tipo comprenderá dos o más ISVD contra TNF, que pueden ser iguales o diferentes y cuando son diferentes pueden dirigirse contra el mismo epítipo en TNF o contra diferentes epítopos en TNF (en el último caso, para proporcionar un compuesto biparatópico o multiparatópico de la divulgación). Un compuesto de la invención de este tipo también puede tener semivida prolongada;

55 - (esencialmente) bivalente, trivalente (o multivalente) y bio-específico o tri-específico (o multiespecífico). Un compuesto de la invención de este tipo se dirigirá contra TNF y al menos otra diana. Tal como se describe en el presente documento, dicha otra diana puede ser por ejemplo otra diana terapéuticamente relevante (es decir, distinta de TNF) para proporcionar un compuesto de la divulgación que es bio-específico con respecto a TNF y dicha otra diana terapéutica. Dicha otra diana también puede ser una diana que proporciona semivida aumentada (tal como albúmina sérica humana), para proporcionar un compuesto de la divulgación que tiene semivida aumentada. Tal como

60

también se menciona en el presente documento, tal otra diana puede permitir también que el compuesto de la divulgación se dirija a células, tejidos u órganos específicos o puede permitir que el compuesto de la divulgación se internalice en una célula. También es posible combinar estos enfoques/ISVD, por ejemplo para proporcionar un compuesto de la divulgación que es biespecífico para TNF y para al menos otra diana terapéuticamente relevante y que tiene semivida prolongada.

De nuevo, preferiblemente, cuando estos compuestos de la divulgación contienen uno o más ISVD distintos del al menos un agente de unión a TNF de la invención, al menos uno y preferiblemente todos estos otros ISVD contendrán dentro de su secuencia una o más mutaciones de región de entramado que reducen la unión de anticuerpos preexistentes (tal como, en particular, una combinación de residuos de aminoácido/mutaciones en las posiciones 11, 89, 110 y/o 112 que es tal como se describe en el presente documento para los agentes de unión a TNF de la invención y/o tal como se describe generalmente en el documento WO2015/173325). Además, cuando tales compuestos de la divulgación tienen un agente de unión a TNF de la invención en su extremo C-terminal, entonces dicho agente de unión a TNF C-terminal (y como resultado, el compuesto de la divulgación) tendrá preferiblemente una extensión C-terminal $X_{(n)}$ tal como se describe en el presente documento. De manera similar, cuando tales compuestos de la divulgación tienen otro ISVD en su extremo C-terminal (es decir, no un agente de unión a TNF de la invención, sino por ejemplo un ISVD que prolonga la semivida), entonces dicho ISVD C-terminal (y como resultado, el compuesto de la invención) tendrá preferiblemente una extensión C-terminal $X_{(n)}$ tal como se describe en el presente documento y/o contendrá dentro de su secuencia una o más mutaciones de región de entramado que reducen la unión de anticuerpos preexistentes (de nuevo, tal como se describe adicionalmente en el presente documento y en el documento WO2015/173325).

Tal como estará claro para un experto, cuando un compuesto de la divulgación se destina para uso tópico (por ejemplo sobre la piel o en el ojo) o se pretende por ejemplo que tenga una acción terapéutica (localizada) en alguna parte en por ejemplo el tracto GI (gastrointestinal; por ejemplo tras administración oral o administración mediante supositorio) o en los pulmones (por ejemplo tras administración mediante inhalación) o se pretende de lo contrario que se aplique directamente a su lugar de acción deseado (por ejemplo, mediante inyección directa), un compuesto de la divulgación no requerirá habitualmente prolongación de la semivida. Además, para el tratamiento de determinados estados o indicaciones agudas, puede de manera preferible no tener una semivida prolongada. En estos casos, se prefiere el uso de un compuesto monovalente de la divulgación o de un compuesto de la divulgación (que comprende el agente de unión a TNF) sin prolongación de la semivida (por ejemplo, un compuesto de la invención que es bivalente o biparatópico con respecto a TNF).

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales compuestos de la divulgación se representan esquemáticamente en la tabla C-1 más adelante, y cada uno de ellos forma un aspecto adicional de la invención. Otros ejemplos de compuestos adecuados de la divulgación sin prolongación de la semivida estarán claros para el experto basándose en la divulgación en el presente documento.

Tal como estará claro para un experto, cuando un compuesto de la divulgación se destina para administración sistémica y/o para prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno crónico, se preferirá habitualmente que dicho compuesto de la divulgación tenga semivida aumentada (tal como se define en el presente documento), es decir, en comparación con el/los agente(s) de unión a TNF presente(s) en tal compuesto de la divulgación. Más preferiblemente, un compuesto de la invención de este tipo contendrá un ISVD que prolonga la semivida tal como, preferiblemente, un ISVD y en particular un Nanobody que se une a albúmina sérica humana (tal como se describe en el presente documento).

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales compuestos de la divulgación se representan esquemáticamente en la tabla C-2 más adelante, y cada uno de ellos forma un aspecto adicional de la invención. Otros ejemplos de compuestos de la divulgación adecuados con prolongación de la semivida estarán claros para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Generalmente, para compuestos de la divulgación con prolongación de la semivida, la presencia de una extensión C-terminal es mucho más preferida.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden usarse como un "elemento estructural" para la preparación de un compuesto, tal como un polipéptido de la divulgación, que puede contener opcionalmente uno o más "elementos estructurales" adicionales, tales como ISVD, contra el mismo u otro epítipo en TNF y/o contra uno o más antígenos, proteínas o dianas distintos de TNF, por ejemplo elementos estructurales que tienen un modo de acción terapéutico.

Generalmente, los compuestos, polipéptidos o constructos que comprenden o consisten esencialmente en un único elemento estructural, un único dominio variable individual de inmunoglobulina o un único Nanobody se denominarán en el presente documento compuestos "monovalentes" o polipéptidos "monovalentes" o "constructos monovalentes", respectivamente. Los compuestos, polipéptidos o constructos que comprenden dos o más elementos estructurales o unidades de unión (tales como por ejemplo, ISVD) también se denominarán en el presente documento compuestos, polipéptidos o constructos "multivalentes", y los elementos estructurales/ISVD presentes en tales compuestos, polipéptidos o constructos también se denominarán en el presente documento como que están en un "formato multivalente". Por ejemplo, un compuesto o polipéptido "bivalente" puede comprender dos dominios variables

individuales de inmunoglobulina, opcionalmente unidos por medio de un secuencia de ligador, mientras que un compuesto o polipéptido “trivalente” puede comprender tres dominios variables individuales de inmunoglobulina, opcionalmente unidos por medio de dos secuencias de ligador; mientras que un compuesto o polipéptido “tetravalente” puede comprender cuatro dominios variables individuales de inmunoglobulina, opcionalmente unidos por medio de tres secuencias de ligador, etc.

En un compuesto, polipéptido o constructo multivalente, los dos o más ISVD, tales como Nanobodies pueden ser iguales o diferentes, y pueden dirigirse contra el mismo antígeno o determinante antigénico (por ejemplo contra la(s) misma(s) parte(s) o epítipo(s) o contra diferentes partes o epítipos) o pueden dirigirse alternativamente contra diferentes antígenos o determinantes antigénicos; o cualquier combinación adecuada de los mismos. Los compuestos, polipéptidos o constructos que contienen al menos dos elementos estructurales (tales como por ejemplo, ISVD) en los que al menos un elemento estructural se dirige contra un primer antígeno (es decir, TNF) y al menos un elemento estructural se dirige contra un segundo antígeno (es decir, diferente de TNF) también se denominarán compuestos, polipéptidos o constructos “multiespecíficos”, respectivamente, y los elementos estructurales (tales como por ejemplo, ISVD) presentes en tales compuestos, polipéptidos o constructos también se denominarán en el presente documento como que están en un “formato multiespecífico”. Por tanto, por ejemplo, un compuesto o polipéptido “biespecífico” de la divulgación es un compuesto o polipéptido que comprende al menos un ISVD dirigido contra un primer antígeno (es decir, TNF) y al menos un ISVD adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de TNF), mientras que un compuesto o polipéptido “triespecífico” de la divulgación es un compuesto o polipéptido que comprende al menos un ISVD dirigido contra un primer antígeno (es decir, TNF), al menos un ISVD adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de TNF) y al menos un ISVD adicional dirigido contra un tercer antígeno (es decir, diferente de tanto TNF como del segundo antígeno); etc.

Compuestos “multiparatópicos”, polipéptidos “multiparatópicos” y constructos “multiparatópicos”, tales como por ejemplo, compuestos, polipéptidos o constructos “biparatópicos”, o compuestos, polipéptidos o constructos “triparatópicos”, comprenden o consisten esencialmente en dos o más elementos estructurales que tiene cada uno un parátipo diferente.

Por consiguiente, los ISVD de la invención que se unen a TNF pueden estar en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o pueden formar parte de un compuesto, polipéptido o constructo, que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más ISVD que se unen a TNF y que pueden comprender opcionalmente además una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas unidas opcionalmente por medio de uno o más ligadores adecuados). La presente divulgación se refiere a un compuesto, polipéptido o constructo que comprende o consiste esencialmente en al menos un ISVD según la invención, tal como uno o más ISVD de la invención (o fragmentos adecuados de los mismos), que se unen a TNF tal como se define en el presente documento.

El uno o más ISVD de la invención pueden usarse como unidad de unión o elemento estructural en un compuesto, polipéptido o constructo de este tipo, para proporcionar un compuesto, polipéptido o constructo monovalente, multivalente o multiparatópico de la divulgación, respectivamente, todo tal como se describe en el presente documento. La presente divulgación se refiere también por tanto a un compuesto o polipéptido que es monovalente que comprende o que consiste esencialmente en un polipéptido monovalente o ISVD de la invención. La presente divulgación se refiere también por tanto a un compuesto, polipéptido o constructo que es un compuesto multivalente, polipéptido multivalente o constructo multivalente, respectivamente, tal como por ejemplo, un compuesto, polipéptido o constructo bivalente o trivalente que comprende o que consiste esencialmente en dos o más ISVD de la invención (para compuestos o polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al.* (J. Biol. Chem. 276: 7346-7350, 2001), así como a por ejemplo los documentos WO 96/34103, WO 99/23221 y WO 2010/115998).

La divulgación se refiere además a un compuesto o polipéptido multivalente (también denominado en el presente documento “*compuesto(s) multivalente(s) de la invención*” y “*polipéptido(s) multivalente(s) de la invención*”, respectivamente) que comprende o que consiste (esencialmente) en al menos un ISVD (o fragmentos adecuados del mismo) dirigido contra TNF, preferiblemente TNF humano, y un ISVD adicional.

En un aspecto, en su forma más simple, el compuesto, polipéptido o constructo multivalente de la invención es un compuesto, polipéptido o constructo bivalente de la divulgación que comprende un primer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra TNF, y un segundo ISVD idéntico, tal como un Nanobody, dirigido contra TNF, en el que dichos primeros y dichos segundos ISVD, tales como Nanobodies, pueden unirse opcionalmente por medio de una secuencia de ligador (tal como se define en el presente documento). En su forma más simple un compuesto, polipéptido o constructo multivalente de la divulgación puede ser un compuesto, polipéptido o constructo trivalente de la divulgación, que comprende un primer ISVD, tal como Nanobody, dirigido contra TNF, un segundo ISVD idéntico, tal como Nanobody, dirigido contra TNF y un tercer ISVD idéntico, tal como un Nanobody, dirigido contra TNF, en el que dichos primeros, segundos y terceros ISVD de inmunoglobulina, tales como Nanobodies, pueden unirse opcionalmente mediante una o más, y en particular dos, secuencias de ligador.

En otro aspecto, el compuesto, polipéptido o constructo multivalente de la divulgación puede ser un compuesto,

polipéptido o constructo biespecífico de la divulgación, que comprende un primer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra TNF, y un segundo ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra un segundo antígeno, en el que dichos primeros y segundos ISVD, tales como Nanobodies, pueden unirse opcionalmente por medio de una secuencia de ligador (tal como se define en el presente documento); mientras que un compuesto, polipéptido o constructo multivalente de la divulgación puede ser también un compuesto, polipéptido o constructo trispecífico de la divulgación, que comprende un primer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra TNF, un segundo ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra un segundo antígeno y un tercer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra un tercer antígeno, en el que dichos primeros, segundos y terceros ISVD, tales como Nanobodies, pueden unirse opcionalmente por medio de una o más, y en particular dos, secuencias de ligador.

En un aspecto particular, el compuesto, polipéptido o constructo de la divulgación es un compuesto, polipéptido o constructo trivalente, biespecífico, respectivamente. Un compuesto, polipéptido o constructo trivalente, biespecífico de la divulgación en su forma más simple puede ser un compuesto, polipéptido o constructo trivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende dos ISVD idénticos, tales como Nanobodies, contra TNF y un tercer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra otro antígeno, en el que dichos primeros, segundos y terceros ISVD, tales como Nanobodies, pueden unirse opcionalmente por medio de una o más, y en particular dos, secuencias de ligador.

En otro aspecto, el compuesto o polipéptido de la divulgación es un compuesto o polipéptido biespecífico. Un compuesto, polipéptido o constructo biespecífico de la divulgación en su forma más simple puede ser un compuesto, polipéptido o constructo bivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende un ISVD, tal como un Nanobody, contra TNF y un segundo ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra otro antígeno, en el que dichos primeros y segundos ISVD, tales como Nanobodies, pueden unirse opcionalmente por medio de una secuencia de ligador.

En un aspecto preferido, el compuesto, polipéptido o constructo multivalente de la divulgación comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina dirigidos contra TNF. En un aspecto, la divulgación se refiere a un compuesto, polipéptido o constructo que comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD según la invención, tal como 2, 3 ó 4 ISVD (o fragmentos adecuados del mismo), que se unen a TNF. Los dos o más ISVD pueden unirse opcionalmente por medio de uno o más ligadores peptídicos.

En un aspecto preferido, el compuesto, polipéptido o constructo de la divulgación comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD, en el que dichos al menos dos ISVD pueden ser iguales o diferentes, pero de los que al menos un ISVD se dirige contra TNF, tal como que se une a TNF.

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

Las afinidades relativas pueden depender de la ubicación de los ISVD en el compuesto, polipéptido o constructo resultante de la divulgación. Se apreciará que el orden de los ISVD en un compuesto o polipéptido de la divulgación (orientación) puede elegirse según las necesidades del experto en la técnica. El orden de los ISVD individuales así como si el compuesto o polipéptido comprende un ligador es una cuestión de elección de diseño. Algunas orientaciones, con o sin ligadores, pueden proporcionar características de unión preferidas en comparación con otras orientaciones. Por ejemplo, el orden de un primer ISVD (por ejemplo, ISVD 1) y un segundo ISVD (por ejemplo, ISVD 2) en el compuesto, polipéptido o constructo de la divulgación puede ser (desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal): (i) ISVD 1 (por ejemplo, Nanobody 1) - [ligador] - ISVD 2 (por ejemplo, Nanobody 2); o (ii) ISVD 2 (por ejemplo, Nanobody 2) - [ligador]- ISVD 1 (por ejemplo, Nanobody 1); (en el que el ligador es opcional). La invención abarca todas las orientaciones. Pueden identificarse fácilmente compuestos, polipéptidos y constructos que contienen una orientación de ISVD que proporciona características de unión deseadas mediante examen de rutina.

En los compuestos o constructos de la divulgación, tales como los polipéptidos de la divulgación, los dos o más elementos estructurales, tales como por ejemplo ISVD, y los opcionalmente uno o más de otros grupos, fármacos, agentes, residuos, restos o unidades de unión pueden unirse directamente entre sí (tal como se describe por ejemplo en el documento WO 99/23221) y/o pueden unirse entre sí por medio de uno o más espaciadores o ligadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos. Espaciadores o ligadores adecuados para su uso en compuestos o polipéptidos multivalentes y multispecíficos estarán claros para el experto, y pueden ser generalmente cualquier ligador o espaciador usado en la técnica para unir secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, dicho ligador o espaciador es adecuado para su uso en la construcción de compuestos, constructos, proteínas o polipéptidos que se destinan para uso farmacéutico.

En una realización, la divulgación se refiere a un compuesto o polipéptido tal como se define en el presente documento, en el que dichos ISVD se unen directamente entre sí o se unen mediante un ligador. En otra realización, la divulgación se refiere a un compuesto o polipéptido tal como se define en el presente documento, en el que se unen un primer ISVD y/o un segundo ISVD y/o posiblemente un tercer ISVD y/o posiblemente un ISVD que se une a

albúmina sérica por medio de un ligador.

Algunos ligadores y espaciadores particularmente preferidos incluyen los espaciadores y ligadores que se usan en la técnica para unir fragmentos de anticuerpo o dominios de anticuerpo. Estos incluyen los ligadores mencionados en la técnica anterior general citada anteriormente, así como por ejemplo ligadores que se usan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos ScFv (en este sentido, sin embargo, debe indicarse que, mientras que en diacuerpos y en fragmentos ScFv, la secuencia de ligador usada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permiten que los dominios V_H y V_L pertinentes se junten para formar el sitio de unión a antígeno completo, no existe limitación particular sobre la longitud o la flexibilidad del ligador usado en el polipéptido de la divulgación, puesto que cada ISVD, tal como un Nanobody, forma por sí mismo un sitio de unión a antígeno completo).

Por ejemplo, un ligador puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada, y en particular secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferiblemente entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos de aminoácido. Algunos ejemplos preferidos de tales secuencias de aminoácidos incluyen ligadores de gly-ser, por ejemplo del tipo $(gly_xser_y)_z$, tal como (por ejemplo $(gly_4ser)_3$ o $(gly_3ser_2)_3$, tal como se describe en el documento WO 99/42077 y los ligadores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las solicitudes de Ablynx mencionadas en el presente documento (véanse, por ejemplo los documentos WO 06/040153 y WO 06/122825), así como regiones de tipo bisagra, tales como las regiones de bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural o secuencias similares (tales como las descritas en el documento WO 94/04678). Se representan ligadores preferidos en la tabla E, por ejemplo SEQ ID NO: 85-100.

Algunos otros ligadores particularmente preferidos son polialanina (tal como AAA), así como los ligadores GS30 (SEQ ID NO: 85 en el documento WO 06/122825) y GS9 (SEQ ID NO: 84 en el documento WO 06/122825).

En una realización, la invención se refiere a un compuesto tal como se define en el presente documento, en el que dicho ligador se elige del grupo que consiste en ligadores de 5GS, 7GS, 9GS, 10GS, 15GS, 18GS, 20GS, 25GS, 30GS, 35GS y 40GS.

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

Dentro del alcance de la divulgación de la invención se abarca que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del/de los ligador(es) usado(s) (aunque no críticas, tal como es habitualmente para ligadores usados en fragmentos ScFv) pueden tener alguna influencia sobre las propiedades del compuesto o constructo final de la divulgación, tal como el polipéptido de la divulgación, incluyendo pero sin limitarse a la afinidad, especificidad o avidéz por una quimiocina, o por uno o más de los otros antígenos. Basándose en la divulgación en el presente documento, el experto será capaz de determinar el/los ligador(es) óptimo(s) para su uso en un compuesto o constructo específico de la divulgación, tal como el polipéptido de la divulgación, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Por ejemplo, en compuestos o polipéptidos multivalentes de la divulgación que comprenden elementos estructurales, tales como ISVD o Nanobodies dirigidos contra TNF y otra diana, la longitud y flexibilidad del ligador son preferiblemente tales que permiten que cada elemento estructural, tal como un ISVD, de la invención presente en el polipéptido se una a su diana relacionada, por ejemplo el determinante antigénico en cada una de las dianas. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto será capaz de determinar el/los ligador(es) óptimo(s) para su uso en un compuesto o constructo específico de la divulgación, tal como un polipéptido de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

También está dentro del alcance de la divulgación que el/los ligador(es) usado(s) confiera(n) una o más de otras propiedades o funcionalidad favorables a los compuestos o constructos de la divulgación, tales como los polipéptidos de la divulgación, y/o proporcione(n) uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la unión de grupos funcionales (por ejemplo tal como se describe en el presente documento para los derivados de los ISVD de la invención). Por ejemplo, ligadores que contienen uno o más residuos de aminoácido cargados pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que ligadores que forman o contienen pequeños epítomos o etiquetas pueden usarse para los fines de detección, identificación y/o purificación. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto será capaz de determinar los ligadores óptimos para su uso en un compuesto, polipéptido o constructo específico de la divulgación, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Finalmente, cuando se usan dos o más ligadores en los compuestos o constructos tales como polipéptidos de la divulgación, estos ligadores pueden ser iguales o diferentes. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto será capaz de determinar los ligadores óptimos para su uso en un compuesto o constructo o polipéptido específico de la divulgación, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

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

La divulgación también se refiere a secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos y constructos descritos en el presente documento. La divulgación incluye además constructos genéticos que incluyen las secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos anteriores y uno o más elementos para constructos genéticos conocidos *per se*. El constructo genético puede estar en forma de un plásmido o vector. De nuevo, tales constructos pueden ser generalmente tal como se describe en las solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V., tales como por ejemplo los documentos WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

En un aspecto la divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica para un ISVD, polipéptido, compuesto o constructo según la divulgación.

En otro aspecto la divulgación se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la divulgación.

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

En un aspecto la divulgación se refiere a un huésped o célula huésped que comprende un ácido nucleico según la divulgación, o un vector de expresión según la divulgación.

La divulgación también se refiere a un método para preparar una secuencia de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteína de fusión, compuestos o constructo tal como se describe en el presente documento, método que comprende cultivar o mantener un célula huésped tal como se describe en el presente documento en condiciones tales que dicha célula huésped produce o expresa una secuencia de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteína de fusión, compuestos o constructo tal como se describe en el presente documento, y comprende además opcionalmente aislar la secuencia de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteína de fusión, compuestos o constructo así producidos. De nuevo, tales métodos pueden realizarse tal como se describe generalmente en las solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V., tales como por ejemplo los documentos WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

En un aspecto particular la divulgación se refiere a un método para producir un ISVD según la invención o un compuesto según la divulgación o un polipéptido según la divulgación, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) expresar, en una célula huésped u organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico tal como se define en el presente documento; seguido opcionalmente por:

b) aislar y/o purificar el ISVD según la invención, el compuesto según la divulgación o el polipéptido según la divulgación, respectivamente.

La divulgación también se refiere a una composición que comprende al menos una secuencia de aminoácidos, agente de unión a TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo tal como se describe en el presente documento.

La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una secuencia de aminoácidos, agente de unión a TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo tal como se describe en el presente documento, y opcionalmente al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprende uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tales preparaciones, portadores, excipientes y diluyentes pueden ser generalmente tal como se describe en las solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V., tales como por ejemplo los documentos WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

Cuando secuencias de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos descritos en el presente documento tienen una semivida aumentada, se administran preferiblemente a la circulación. Como tales, pueden administrarse de cualquier manera adecuada que permita que las secuencias de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos entren en la

circulación, tal como por vía intravenosa, por medio de inyección o infusión, o de cualquier otra manera adecuada (incluyendo administración oral, administración subcutánea, administración intramuscular, administración a través de la piel, administración intranasal, administración por medio de los pulmones, etc.) que permita que las secuencias de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos entren en la circulación. Los métodos y vías de administración adecuados serán evidentes para el experto, de nuevo por ejemplo también a partir de las enseñanzas de las solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V., tales como por ejemplo los documentos WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 o WO 2009/068627.

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

En el contexto de la presente invención, el término “prevención y/o tratamiento” no sólo comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, sino también generalmente comprende prevenir la aparición de la enfermedad, ralentizar o revertir el progreso de la enfermedad, prevenir o ralentizar la aparición de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir y/o aliviar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir la gravedad y/o la duración de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma y/o prevenir un aumento adicional en la gravedad de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma, prevenir, reducir o revertir cualquier daño fisiológico provocado por la enfermedad, y generalmente cualquier acción farmacológica que sea beneficiosa para el paciente que está tratándose. No es necesario que una composición de la divulgación efectúe una cura completa, o erradique todos los síntomas o manifestaciones de una enfermedad, para que constituya un agente terapéutico viable. Tal como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado patológico dado, pero no es necesario que supriman todas las manifestaciones de la enfermedad para que se consideren agentes terapéuticos útiles. De manera similar, no es necesario que un tratamiento administrado profilácticamente sea completamente eficaz en la prevención de un estado para que constituya un agente profiláctico viable. Simplemente es suficiente reducir el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o la gravedad de sus síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o reduciendo la probabilidad de que se produzca la enfermedad o empeore en un sujeto.

En una realización, un indicio de que se ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición al paciente, es una mejora sostenida con respecto al nivel inicial de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un ISVD, compuesto o polipéptido de la presente divulgación formulado junto con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un ISVD, compuesto o polipéptido de la divulgación quiere decirse una cantidad de la composición que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado, a una razón de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico es suficiente para “tratar” al paciente tal como se usa el término en el presente documento.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición, constructo, compuesto, agente de unión a TNF, ISVD o polipéptido tal como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento de una enfermedad y/o trastorno del tracto digestivo.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición, constructo, compuesto, agente de unión a TNF, ISVD o polipéptido tal como se describe en el presente documento, en el que dicha enfermedad y/o trastorno del tracto digestivo es enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, mucositis, estomatitis aftosa, enfermedad celiaca, traumatismo en el tracto digestivo y cánceres en el tracto digestivo.

Los pacientes con síndrome del intestino irritable tienen una permeabilidad intestinal alterada a pesar de tener pocos o ningún cambio histológico detectable en los intestinos (Dunlop *Am J Gastroenterol.* Junio de 2006; 101(6): 1288-94). Los pacientes con enfermedad celiaca tienen una permeabilidad intestinal alterada y un daño característico en las vellosidades del intestino delgado que puede distinguirse de IBD. Se cree que la enfermedad inflamatoria intestinal resulta de una respuesta inmunitaria desregulada iniciada por interacciones microbios-huésped. El sistema inmunitario responde a bacterias comensales no patógenas generando inflamación crónica. De manera similar, en enterocolitis necrotizante, un sistema inmunitario subdesarrollado sometido a estrés genera una respuesta inapropiada a las bacterias intestinales normales, induciendo una forma potencialmente mortal de colitis (Jilling *et al*,

2006, J Immunol, 177, 3273-82).

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

En otra realización, la divulgación se refiere a un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, método que comprende administrar, a un sujeto que padece o corre el riesgo de las enfermedades y los trastornos mencionados en el presente documento, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos, agente de unión a TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo de la divulgación, y/o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

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

Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de una o más secuencias de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la divulgación, o de una o más composiciones que comprenden los mismos, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente eficaces. La(s) cantidad(es) o dosis específica(s) que va(n) a administrarse puede determinarla(s) el médico, de nuevo basándose en los factores mencionados anteriormente.

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

Habitualmente, en el método anterior, se usará una única secuencia de aminoácidos, agente de unión a TNF, polipéptido, proteína de fusión, compuesto o constructo de la divulgación. Sin embargo, está dentro del alcance de la divulgación usar dos o más secuencias de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la divulgación en combinación.

Las secuencias de aminoácidos, agente de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la divulgación también pueden usarse en combinación con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como un régimen de tratamiento combinado, que puede conducir o no a un efecto sinérgico. De nuevo, el médico podrá seleccionar tales compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basándose en los factores mencionados anteriormente y su juicio experto.

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

La eficacia del régimen de tratamiento usado según la divulgación puede determinarse y/o seguirse de cualquier

manera conocida *per se* para la enfermedad o el trastorno implicado, tal como resultará evidente para el médico. El médico también podrá, cuando sea apropiado y o en una base de caso a caso, cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir efectos secundarios no limitados, y/o para lograr un equilibrio apropiado entre lograr el efecto terapéutico deseado por un lado y evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados por otro lado.

Generalmente, se seguirá el régimen de tratamiento hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o durante tanto tiempo como tenga que mantenerse el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede determinarlo el médico.

Puesto que las secuencias de aminoácidos, agentes de unión a TNF, polipéptidos, proteínas de fusión, compuestos o constructos de la divulgación pueden unirse a TNF, pueden usarse en particular para la prevención y o el tratamiento de enfermedades o trastornos que pueden tratarse mediante otros fármacos biológicos (como anticuerpos, por ejemplo adalimumab/HUMIRA™ o infliximab/ REMICADE™) que pueden unirse a TNF y/o modular TNF. Tales enfermedades y trastornos serán evidentes para el experto. Los agentes de unión a TNF de la invención pueden usarse en particular para la prevención y el tratamiento de las enfermedades y los trastornos mencionados en los documentos WO 2004/041862 y WO 2006/122786.

Tal como se mencionó, un aspecto específico de la divulgación se refiere a agentes de unión a TNF de la invención que están en formato monovalente. Estos agentes de unión a TNF monovalentes de la invención son particularmente adecuados para aplicaciones tópicas (incluyendo aplicaciones sobre la piel, en el tracto GI o los pulmones) y/o para administración tópica (por ejemplo a la piel), administración oral (por ejemplo al tracto GI), administración mediante supositorio (de nuevo, por ejemplo al tracto GI) y/o administración a los pulmones (por ejemplo mediante inhalación). Como tales, pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos de la piel, los pulmones o el tracto GI que pueden prevenirse o tratarse mediante aplicación de un inhibidor de TNF a la piel, los pulmones o el tracto GI, respectivamente (tales como enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias que afectan a la piel, los pulmones o el tracto GI, respectivamente).

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD tal como se describe en el presente documento, en el que la composición, el compuesto, el constructo, el agente de unión a TNF, el polipéptido o el ISVD se administra por vía tópica al tracto digestivo.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD tal como se describe en el presente documento, en el que la composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía oral en una forma de dosificación adecuada para administración oral al tracto gastrointestinal (GI).

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD tal como se describe en el presente documento, en el que la composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD se administra en una forma de dosificación para administración oral al tracto GI en el que la forma de dosificación se selecciona de comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD tal como se describe en el presente documento, en el que la composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía rectal para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del tracto digestivo.

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD tal como se describe en el presente documento, en el que la composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía rectal en una forma de dosificación para administración rectal, preferiblemente seleccionada de supositorios y enemas.

En una realización, la presente divulgación se refiere también a una composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD tal como se describe en el presente documento, en el que la composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD se administra por vía parenteral mediante inyección subcutánea, inyección intracutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intralesional o técnicas de infusión.

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

ejemplos preferidos de agentes de unión a TNF de la invención que son particularmente adecuados para estos fines.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un agente de unión a TNF de la invención (tal como se describió en el presente documento) que está esencialmente en formato monovalente (y que tiene preferiblemente una mutación de D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos de la piel, los pulmones o el tracto GI, y en particular en la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias que afectan a la piel, los pulmones o el tracto GI. Dicho agente de unión a TNF es SEQ ID NO: 40.

La invención también se refiere a un agente de unión a TNF de la invención (tal como se describió en el presente documento) que está esencialmente en formato monovalente (y que tiene preferiblemente una mutación de D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades o trastornos del tracto GI tales como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, mucositis, estomatitis aftosa, enfermedad celiaca, traumatismo en el tracto digestivo y/o cánceres en el tracto digestivo, en particular IBD y enfermedad de Crohn. De nuevo, dicho agente de unión a TNF es SEQ ID NO: 40.

La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que está destinada a (y/o es adecuada para) aplicación tópica a la piel, administración mediante inhalación u otra administración a los pulmones, y/o administración oral, administración rectal u otra administración al tracto GI, que comprende un agente de unión a TNF de la invención que está esencialmente en formato monovalente (y que tiene preferiblemente una mutación de D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal). De nuevo, dicho agente de unión a TNF se elige preferiblemente del grupo que consiste en 40, 39, 36, 64, 69, 37, 38, 41, 62-63 y 65-68, en particular SEQ ID NO: 40, 39, 36, 64 y 69, lo más particularmente SEQ ID NO: 40. La invención también se refiere al uso de un agente de unión a TNF de la invención que está esencialmente en formato monovalente (y que tiene preferiblemente una mutación de D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) en un método para el prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno de la piel de un sujeto que necesita tal tratamiento.

La invención también se refiere al uso de un agente de unión a TNF de la invención que está esencialmente en formato monovalente (y que tiene preferiblemente una mutación de D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno de la piel, de un sujeto que necesita tal tratamiento.

La invención también se refiere al uso de un agente de unión a TNF de la invención que está esencialmente en formato monovalente (y que tiene preferiblemente una mutación de D o E1D en la posición 1 y una extensión C-terminal tal como alanina C-terminal) en un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos del tracto GI tales como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, mucositis, estomatitis aftosa, enfermedad celiaca, traumatismo en el tracto digestivo y/o cánceres en el tracto digestivo, en particular IBD o enfermedad de Crohn, de un sujeto que necesita tal tratamiento.

Tal como se mencionó anteriormente, en sitios de inflamación la barrera mucosa del tracto digestivo se ve a menudo comprometida, debido a lo cual las proteínas administradas por vía oral pueden entrar en los tejidos intestinales y la circulación sistémica. En una realización, la invención también se refiere por tanto a una composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD tal como se describe en el presente documento, en el que la composición, compuesto, constructo, agente de unión a TNF, polipéptido o ISVD alcanza los tejidos intestinales y la circulación sistémica de un paciente.

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

La invención se describirá adicionalmente por medio de los siguientes aspectos preferidos, ejemplos y figuras no limitativos, en los que:

- la figura 1 es una tabla que enumera algunas de las posiciones de aminoácido a la que se hará referencia específicamente en el presente documento y su numeración según algunos sistemas de numeración alternativos (tales como Aho y IMGT);

- la figura 2 muestra una alineación de SEQ ID NO: 1, 59 y 58;

- la figura 3 enumera las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en el presente documento;

- la figura 4 muestra una alineación de SEQ ID NO: 1, 8 con 41 y 58;

- la figura 5 muestra una alineación de SEQ ID NO: 1, 31 y 36 con 41;

5 - la figura 6 muestra dos gráficos correspondientes de puntos de datos obtenidos en el ejemplo 1 cuando se sometieron a prueba 96 muestras de suero (66 de sujetos humanos sanos y 30 de pacientes con SLE) para determinar la unión a las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 58 (con mutación Q108L), Referencia A, Referencia A (L11V, V89L)-Ala, Referencia A (L11V, A74S, V89L)-Ala y Referencia A (L11V, S49A, V89L)-Ala. Cada punto representa el nivel de unión para una de las 96 muestras sometidas a prueba. Los puntos de datos mostrados en el panel a mano derecha y el panel a mano izquierda son iguales; en el panel a mano derecha los puntos de datos medidos con cada muestra individual para cada uno de los compuestos sometidos a prueba (es decir para SEQ ID NO: 58 (Q108L), Referencia A, Referencia A (L11V, V89L)-A, Referencia A (L11V, A74S, V89L)-A y Referencia A (L11V, S49A, V89L)-A) están conectados por medio de una línea (como resultado, el descenso de la línea proporciona un indicio del grado en el que la unión de anticuerpos preexistentes se reduce cuando se introducen las mutaciones de la invención y la alanina C-terminal);

15 - la figura 7 es una tabla que enumera los datos de unión (5 columnas que proporcionan niveles de unión a PreAb normalizados (RU a 125 segundos) y 4 columnas que proporcionan el porcentaje de reducción en la unión a PreAb en comparación con la Referencia A de los puntos de datos compilados en la figura 6.

20 - Figura 8 (A) Sitios de escisión de tripsina y quimotripsina predichos ("P") y determinados experimentalmente ("E") basándose en la secuencia de A016600015. (B) Análisis de A016600015 en gel de SDS PAGE teñido con Coomassie. (C) Resultado a modo de ejemplo de un análisis de digesto trípico por medio de RPC CL-EM de la secuencia de A016600015.

- Figura 9 Representación esquemática del modelo de SHIME.

25 - Figura 10 FACS de competición sobre células HEK293 H-mTNF tratadas con Enbrel (CE30 = 0,02 nM; panel A) y Enbrel (CE90 = 0,2 nM; panel B). IRR000027 = Nanobody irrelevante.

30 - La figura 11 muestra los resultados de expresión de A016600021, A016600039 y A016600040 en un gel de Bis-Tris con NuPage al 12% en condiciones no reductoras, se aplicó una muestra de 5 μ l. Los carriles son los siguientes: (1) A016600021; (2) A016600039; (3) A016600040; (4) comparador irrelevante; (5) comparador irrelevante; (6) patrón Precision Plus Protein (BioRad); (7) patrón de 0,5 μ g; (8) patrón de 1,0 μ g; (9) patrón de 2,5 μ g.

Ejemplos

35 Los presentes inventores exponen la optimización de la secuencia de aminoácidos ("optimización de secuencias") de agentes de unión a TNF. En este caso, los agentes de unión a TNF están destinados a administración oral, debido a lo cual los agentes de unión a TNF deben ser preferiblemente estables a proteasas. Además, en el proceso de optimización de secuencias también se pretende (1) humanizar los agentes de unión a TNF; (2) desactivar posibles epítopos de anticuerpos preexistentes; así como (3) desactivar sitios para modificaciones postraduccionales (PTM).
40 Al mismo tiempo estas características deben estar en conformidad con las características funcionales de los agentes de unión a TNF, es decir inhibición de TNF α , que preferiblemente debe ser aproximadamente la misma o incluso mejorada.

Ejemplo 1: Producción de Nanobody en *Pichia pastoris* y purificación por medio de unión a proteína-A

45 Se hicieron crecer células de *Pichia pastoris* X33 que contenían los constructos de Nanobody anti-TNF α (30°C, 250 rpm) en placas de 24 pocillos (24 ml) en un tampón BGCM citrato. Tras dos días, se cambió el medio a tampón que contenía metanol (BMCM citrato) para inducir la expresión. Se añadió metanol nuevo de manera regular para compensar el consumo y la evaporación de metanol, y se recogió el medio tras dos días. Se purificaron los Nanobodies por medio de captura sobre columna de proteína-A (Poros) o MEP Hipercel (Pall) seguido por elución en tampón glicina según las instrucciones del fabricante. Se desalaron posteriormente los Nanobodies en PBS usando una columna Zebaspín de 2 ml (Pierce). Se concentraron las fracciones usando columnas VivaSpin (MWCO 5000, PES). Se midieron las concentraciones de las fracciones de Nanobody usando el sistema Trinean Dropsense. La concentración se basaba en la medición de DO280 con normalización para los valores de DO340. Se verificaron la pureza e integridad de los Nanobodies mediante análisis de SDS-PAGE y EM usando un sistema de HPLC de fase inversa acoplado a un espectrómetro de masas de ESI-Q-TOF (Q-TOF Ultimate (Waters)).
55

Ejemplo 2: Humanización

60 Las secuencias de proteína de los agentes de unión a TNF de la presente invención se recuperaron finalmente de llamas y son parcialmente distintas de anticuerpos homólogos que se producen de manera natural en seres humanos. Por tanto, estos agentes de unión a TNF son potencialmente inmunogénicos cuando se administran a pacientes humanos.

65 Generalmente, para fines de humanización las secuencias de Nanobody se hacen más homólogas con respecto a la secuencia consenso de línea germinal humana. Con la excepción de los residuos "distintivos" de Nanobody, los

aminoácidos específicos en las regiones de entramado que difieren entre el Nanobody y una secuencia consenso de línea germinal humana se alteran al homólogo humano de manera que la estructura, actividad y estabilidad de la proteína se mantienen preferiblemente intactas.

5 En este caso, tras una alineación con la base de datos de genes V de línea germinal humana, se identificó que DP51 tenía la homología más alta con SEQ ID NO: 58. Se elaboraron todas las posibles permutaciones en vista de alterar la secuencia de Nanobody original más conforme a la secuencia consenso de línea germinal de DP51 humana, al tiempo que se mantenían preferiblemente las otras características de Nanobody intactas o estas características incluso se mejoran.

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

15 Ejemplo 3: Reducción de la unión de anticuerpos preexistentes

3.1 Parte experimental

20 Las muestras humanas usadas en el ejemplo 3.2 a continuación se obtuvieron o bien de fuentes comerciales o bien de voluntarios humanos (tras obtenerse todas las aprobaciones y consentimientos requeridos) y se usaron según los requisitos regulatorios y legales aplicables (incluyendo pero sin limitarse a los referentes a la privacidad de los pacientes y el secreto médico).

25 En el ejemplo 3.2 a continuación, a menos que se indique explícitamente otra cosa, se determinó la unión de anticuerpos preexistentes que están presentes en las muestras usadas (es decir, de voluntarios sanos, pacientes con artritis reumatoide (RA) y pacientes con SLE) a los Nanobodies sometidos a prueba usando ProteOn tal como sigue: se capturaron los Nanobodies o bien sobre albúmina sérica o bien por medio de una etiqueta FLAG3 usando M2 monoclonal anti-FLAG.

30 En caso de unión de anticuerpos preexistentes sobre Nanobodies capturados sobre albúmina sérica humana (HSA), se evaluó usando el sistema ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se usó PBS/Tween (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, Tween20 al 0,005%) como tampón de ejecución y los experimentos se realizaron a 25°C. Los carriles de ligando de un chip sensor ProteOn GLC se activaron con EDC/NHS (velocidad de flujo de 30 μ l/min) y se inyectó HSA a 10 μ g/ml en tampón acetato ProteOn pH 4,5 (velocidad de flujo de 100 μ l/min) para hacer que los niveles de inmovilización fuesen de aproximadamente 3200 RU. Tras la inmovilización, se desactivaron las superficies con etanolamina HCl (velocidad de flujo de 30 μ l/min). Se inyectaron Nanobodies durante 2 minutos a 45 μ l/min sobre la superficie de HSA para hacer que el nivel de captura de Nanobody fuese de aproximadamente 200 RU. Se centrifugaron las muestras que contenían anticuerpos preexistentes durante 2 minutos a 14.000 rpm y se diluyó el sobrenadante 1:10 en PBS-Tween20 (0,005%) antes de inyectarse durante 2 minutos a 45 μ l/min seguido por una etapa de disociación de 400 segundos posterior. Tras cada ciclo (es decir, antes de una nueva etapa de captura de Nanobody e inyección de muestra de sangre), se regeneraron las superficies de HSA con una inyección de 2 minutos de HCl (100 mM) a 45 μ l/min. Se realizaron el análisis de datos y procesamiento de sensogramas con ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se obtuvieron sensogramas que muestran la unión de anticuerpos preexistentes tras doble referenciación restando 1) la disociación de Nanobody-HSA y 2) la unión no específica a carril de ligando de referencia. Se determinaron los niveles de unión de anticuerpos preexistentes estableciendo puntos de notificación a 125 segundos (5 segundos tras el final de la asociación). Se calculó el porcentaje de reducción de la unión de anticuerpos preexistentes en relación con los niveles de unión a los 125 segundos de un Nanobody de referencia.

50 En caso de unión de anticuerpos preexistentes sobre Nanobodies etiquetados con FLAG capturados sobre M2 monoclonal anti-FLAG (Sigma), se valuó usando el sistema ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se usó PBS/Tween (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, Tween20 al 0,005%) como tampón de ejecución y se realizaron los experimentos a 25°C. Los carriles de ligando de un chip sensor ProteOn GLC se activaron con EDC/NHS (velocidad de flujo de 30 μ l/min) y se inyectó AcM M2 anti-FLAG a 10 μ g/ml en tampón acetato ProteOn pH 4.5 (velocidad de flujo de 100 μ l/min) para hacer que los niveles de inmovilización fuesen de aproximadamente 4000 RU. Tras la inmovilización, se desactivaron las superficies con etanolamina HCl (velocidad de flujo de 30 μ l/min). Se inyectaron Nanobodies durante 2 minutos a 45 μ l/min sobre la superficie de M2 anti-FLAG para hacer que el nivel de captura de Nanobody fuese de aproximadamente 100 RU. Para reducir la unión no específica de las muestras de sangre a la superficie de M2 anti-FLAG, se añadió péptido 3xFLAG 100 nM (Sigma) a las muestras de sangre. Se centrifugaron las muestras que contenían anticuerpos preexistentes durante 2 minutos a 14.000 rpm y se diluyó el sobrenadante 1:10 en PBS-Tween20 (0,005%) antes de inyectarse durante 2 minutos a 45 μ l/min seguido por una etapa de disociación de 600 segundos posterior. Tras cada ciclo (es decir, antes de una nueva etapa de captura de Nanobody e inyección de muestra de sangre), se regeneraron las superficies de M2 anti-FLAG con una inyección de 10 segundos de glicina pH 1,5 (10 mM) a 150 μ l/min. Se realizaron el análisis de datos y procesamiento de sensogramas con ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se obtuvieron sensogramas que

65

mostraban la unión de anticuerpos preexistentes tras doble referenciación restando 1) la disociación de Nanobody-M2 anti-FLAG y 2) la unión no específica a carril de ligando de referencia. Se determinaron los niveles de unión de anticuerpos preexistentes estableciendo puntos de notificación a 125 segundos (5 segundos tras el final de la asociación). Se calculó el porcentaje de reducción de la unión de anticuerpos preexistentes en relación con los niveles de unión a los 125 segundos de un Nanobody de referencia.

3.2: La introducción de las mutaciones de la invención en la Referencia A (SEQ ID NO: 1) conduce a una reducción en la unión de anticuerpos preexistentes.

Se usaron las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 58 (con la mutación Q108L), Referencia A, Referencia A (L11V, V89L)-Ala, Referencia A (L11V, A74S, V89L)-Ala y Referencia A (L11V, S49A, V89L)-Ala, todas con una etiqueta de HIS6-FLAG3 N-terminal (SEQ ID NO: 42). Se sometieron a prueba estos Nanobodies para determinar la unión de anticuerpos preexistentes que están presentes en las muestras de 96 muestras de suero de voluntarios humanos sanos. Se capturaron los compuestos usando la etiqueta FLAG y se midió la unión usando ProteOn según el protocolo facilitado en el preámbulo de esta parte experimental.

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

Puede observarse que para la mayoría de las 96 muestras sometidas a prueba, la introducción de las mutaciones según la invención conduce a una reducción en la unión de anticuerpos preexistentes, siendo generalmente el grado de reducción dependiendo del nivel al que los anticuerpos preexistentes en cada muestra podían unirse a la Referencia A.

Ejemplo 4: Evaluación de la estabilidad química

Se evaluó la estabilidad química de los diversos Nanobodies humanizados y/u optimizados por medio de pruebas de estrés por temperatura y oxidación forzada.

Se preparó un nuevo compuesto de referencia, es decir A016600015 (SEQ ID NO: 61). Este nuevo compuesto de referencia es más conforme a los presuntos candidatos clínicos, y por tanto permite una mejor evaluación del impacto de las mutaciones. A016600015 es idéntico a la Referencia A (SEQ ID NO: 1) excepto por una alanina C-terminal y un aspartato en el residuo de aminoácido 1. La Ala C-terminal se introdujo en vista de reducir los PEA según el documento WO 2012/175741 (véase el ejemplo 3). El glutamato N-terminal se sustituyó por un aspartato en el residuo de aminoácido 1 tras una evaluación de la formación de piroglutamato. La actividad de la nueva referencia A016600015 era prácticamente idéntica a la Referencia A (datos no mostrados). Este nuevo compuesto A016600015 se usa además a lo largo de todos los ejemplos como compuesto de referencia a menos que se indique lo contrario.

Basándose en los resultados del ejemplo 3, se introdujeron las mutaciones anti-PEA L11V y V89L (entre otras) en comparación con el nuevo compuesto de referencia A016600015, dando como resultado A016600018 (SEQ ID NO: 37) y A016600019 (SEQ ID NO: 38). Las secuencias se representan en la figura 3.

4.1 Estabilidad frente a la oxidación forzada

Se sometieron muestras de Nanobody del compuesto de referencia A016600015 (1 mg/ml) durante cuatro horas a TA y en la oscuridad a H₂O₂ 10 mM en PBS, en paralelo con muestras de control sin H₂O₂, seguido por cambio de tampón a PBS usando columnas centrifugadoras de desalación Zeba (0,5 ml) (Thermo Scientific). Entonces se analizaron muestras sometidas a estrés y de control por medio de RPC en una máquina de la serie 1200 o 1290 (Agilent Technologies) sobre una columna Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies) a 70°C. Se cuantificó la oxidación de Nanobodies mediante la determinación del % de área de pico de picos previos que aparecen como resultado de estrés oxidativo, en comparación con el pico de proteína principal.

No se observaron variantes en las muestras con estrés por oxidación del compuesto de referencia A016600015 (datos no mostrados).

4.2 Estabilidad al estrés por temperatura

Se almacenaron muestras de Nanobody (1-2 mg/ml) en PBS durante cuatro semanas a -20°C (control negativo) 25 y 40°C. Tras este periodo de incubación, se digirieron los Nanobodies con tripsina o LysC. Entonces se analizaron los péptidos de muestras de control y sometidas a estrés por medio de RPC en una máquina de la serie 1290 (Agilent Technologies) sobre una columna Acquity UPLC BEH300-C18 (Agilent Technologies) a 60°C. La columna se acopla a un espectrómetro de masas Q-TOF (6530 Accurate Mass Q-TOF (Agilent)). La integración de UV 214 nm de mapa de péptidos o los cromatogramas de EIC (cromatograma de iones extraídos) permite una cuantificación fiable de una modificación dada.

Sólo a 40°C se observaron algunas variantes de piroglutamato e isomerización. De manera notable, el residuo de aminoácido 54D, que está ubicado en la CDR2 expuesta al entorno y posiblemente propensa a isomerización, no mostró prácticamente isomerización. La isomerización del residuo de aminoácido 1 era inapreciable si los Nanobodies se mantenían a o por debajo de 25°C durante periodos de tiempo prolongados.

4.3 Temperaturas de fusión por medio del ensayo de desplazamiento térmico (TSA)

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

Se evaluaron las temperaturas de fusión de diversos Nanobodies por medio de un ensayo de desplazamiento térmico (TSA) esencialmente según Ericsson *et al.* 2006 (Anals of Biochemistry, 357: 289-298). En resumen, se incubaron 5 µl de Nanobodies monovalentes purificados (800 µg/ml) con 5 µl de la sonda fluorescente Sypro Orange (Invitrogen, S6551) (concentración final 10 x) en 10 µl de tampón (fosfato 100 mM, borato 100 mM, citrato 100 mM, NaCl 115 mM, tamponado a diferente pH que oscila entre 3,5 y 9). Se calentaron las muestras en una máquina LightCycler 480II (Roche), desde 37 hasta 99°C a la velocidad de 4,4°C/s, tras lo cual se enfriaron hasta 37°C a una velocidad de 0,03°C/s. Tras el desplegamiento inducido por calor, se exponen parches hidrófobos de las proteínas a los que se une Sypro Orange dando como resultado un aumento de la intensidad de fluorescencia (ex./em. = 465/580 nm). El punto de inflexión de la primera derivada de la curva de intensidad de fluorescencia sirve como medida de la temperatura de fusión (Tm).

Se comparó el compuesto de referencia A016600015 (SEQ ID NO: 61) con A016600018 (SEQ ID NO: 37) y A016600019 (SEQ ID NO: 38). En contraposición a A016600015, tanto A016600018 como A016600019 comprenden las mutaciones anti-PEA L11V y V89L según el ejemplo 3.

Los resultados se representan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3

ID de NB	anti-PEA	cantidad (µg)	Tm (°C) pH7
A016600015	-	87	59
A016600018	L11V V89L	38	59
A016600019	L11V V89L	16	56

Tal como puede observarse a partir de la tabla 4.3, las mutaciones anti-PEA parecen tener o bien ningún efecto sobre la Tm (A016600018) o bien un efecto negativo sobre la Tm (A016600019). De manera notable, la diferencia entre A016600018 ("00018") y A016600019 ("00019") es 78L y 78V, respectivamente. Globalmente, se mostró que cualquier efecto de esta diferencia en el residuo de aminoácido 78 era insignificante en comparación con la introducción de las mutaciones anti-PEA (véase también a continuación).

Cuando se producen, también se observó que la expresión de estas variantes que comprenden las mutaciones anti-PEA era inferior a la óptima. Se cuantificó esto adicionalmente usando el método del ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

De hecho, la cantidad que puede recuperarse de ambas variantes que comprenden las mutaciones anti-PEA era aproximadamente 2 veces inferior (A016600018) o incluso 4 veces inferior (A016600019) a la del Nanobody de referencia. Esto fue una sorpresa completa para los inventores, puesto que la introducción de estas mutaciones anti-PEA L11V y V89L no dio como resultado una caída importante de este tipo en la capacidad para recuperar Nanobodies antes tal como se determinó para cualquier otro clon.

4.4 Estabilidad a proteasas

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

Con el fin de identificar posibles sitios de degradación por proteasas y diseñar variantes más estables, los presentes inventores se dispusieron a identificar los sitios de escisión de tripsina y quimotripsina según métodos convencionales.

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

A partir de esta figura puede concluirse que:

- 5 - CDR3 comprende 9 posibles sitios de escisión de proteasas.
- La mutación de humanización Q75K (VH3-DP51) introdujo un posible sitio de escisión de tripsina.
- La mutación de humanización K73N (VH3-DP51) eliminó un posible sitio de escisión de tripsina.
- 10 - Las mutaciones anti-PEA L11V y V89L fueron neutras en este sentido, es decir estas mutaciones no introdujeron ni eliminaron posibles sitios de escisión de proteasas, tal como se esperaba.

Con el fin de evaluar los sitios de escisión de proteasas predichos en un entorno más *in vivo*, se digirieron los Nanobodies con tripsina y quimotripsina. En particular, se incubaron Nanobodies anti-TNF α en disoluciones de tripsina o α -quimotripsina al 10%. Se sometieron dos μ g de Nanobody a digestión trípica durante 2 h, 4 h y durante la noche a 37°C, o digestión quimotríptica durante 2 h, 4 h o durante la noche a 25°C. Se detuvo la reacción proteolítica mediante la adición de TFA (al 0,1% final). O bien se analizaron las mezclas de reacción por medio de RPC CL-EM o bien se separaron en un gel de SDS PAGE gel y se tiñeron con azul de Coomassie. Usando ImageQuant (GE), se calculó la cantidad de material intacto y se normalizó a 0 h como punto de tiempo de referencia.

En la figura 8B se proporciona un resultado a modo de ejemplo de un digesto trípico sobre un gel de SDS PAGE teñido con Coomassie. En la figura 8C se proporciona un resultado a modo de ejemplo de un análisis de digesto trípico por medio de RPC CL-EM. Los sitios de escisión confirmados experimentalmente (“E”) se representan en la figura 8A como tripsina (“E”) y quimotripsina (“E”).

A partir de la figura 8A es evidente que se reduce el número de sitios de escisión reales. No obstante, quedan diversos sitios de reconocimientos trípticos y quimotrípticos.

30 Con el fin de optimizar la resistencia a la tripsina, se seleccionaron 5 posiciones con el fin de diseñar por ingeniería genética una variante optimizada: R38, K64, S94, P95 y R96, dando como resultado la variante A016600013; SEQ ID NO: 65.

35 Sin embargo, la mutación de estos sitios dio como resultado niveles de expresión reducidos y acumulación intracelular de la variante (A016600013; SEQ ID NO: 65). De hecho, cuando se sometió el residuo de aminoácido 38 a retromutación, lo que mejoró la expresión, la variante resultante (A016600014; SEQ ID NO: 66) era de manera completamente contraria a las expectativas más sensibles a proteasas que el compuesto de referencia A016600015 (datos no mostrados). Por tanto, se decidió no mutar estas posiciones en el compuesto de referencia y los Nanobodies en estudio, es decir A016600018 y A016600019.

40 En la tabla 4.4 se representa un resumen de los resultados.

Tabla 4.4

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

45 Ejemplo 5: Estabilidad en fluidos intestinales derivados de un modelo de SHIME

Para investigar la estabilidad de los Nanobodies anti-TNF α en el tracto GI humano, se incubaron los Nanobodies en 5 fluidos diferentes derivados de un SHIME (simulador de ecosistema microbiano intestinal humano, *Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem*), que representa el tracto gastrointestinal humano (GI). El modelo de SHIME es un modelo dinámico validado científicamente del tracto gastrointestinal completo, que se usa para estudiar parámetros fisicoquímicos, enzimáticos y microbianos en el tracto gastrointestinal en un entorno *in vitro* controlado.

55 El modelo de SHIME consiste en cinco reactivos que simulan secuencialmente el estómago (condiciones ácidas y digestión por pepsina), intestino delgado (procesos digestivos) y las 3 regiones del intestino grueso, es decir el colon ascendente (“A”), transversal (“T”) y descendente (“D”) (procesos microbianos). El control cuidadoso de los parámetros ambientales en estos reactores permitió comunidades microbianas completas y estables que son altamente similares tanto en estructura como en función a la comunidad microbiana en las diferentes regiones del colon humano (véase la figura 9). Todos los fluidos GI los proporcionó ProDigest (Technologypark 4, 9052

Zwijnaarde, Bélgica). Se sometieron a prueba los Nanobodies anti-TNF durante un periodo máximo de 39 horas en los fluidos GI. Tras la incubación en los fluidos GI, se determinó la estabilidad de los Nanobodies por medio de pruebas de funcionalidad en un ELISA de competición. Se sometieron a prueba los Nanobodies a una concentración fijada de 100 µg/ml a 37°C en 5 fluidos GI diferentes en el modelo de SHIME. A diferentes puntos de tiempo, se tomaron muestras y se almacenaron a -20°C con o sin la adición de inhibidores de proteasas, según el programa de la tabla 5.1. Se transfirieron las muestras a placas de ELISA recubiertas y posteriormente se sometieron a prueba en el ELISA de competición. En resumen, se recubrió A016600015 a una concentración de 1 µg/ml en PBS. Tras bloquear, se añadió una concentración fijada de biot-hTNFα 0,3 nM junto con una serie de titulación de las variantes en los diferentes fluidos GI. Se realizó la detección con extravidina-HRP.

Tabla 5.1 Programa de incubación

Fluido	Puntos de tiempo
SI en ayunas	0, 1, 2, 4, 6, 8 h*
SI con alimentación	0, 1, 2, 4, 6, 8 h*
Colon A	0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24 h
Colon T	0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24, 39 h
Colon D	0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24, 32 h
PBS	0, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 20, 24, 32 h

*tras la incubación adición de Pefabloc 1 mg/ml y pepstatina 1 µM (inhibidores de proteasas)

En la tabla 5.2 se proporciona un resultado a modo de ejemplo en colon "T".

Tabla 5.2

		0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	15 h	20 h	24 h	39 h
00015	CI50	7,3E-10	5,0E-10	6,4E-10	6,2E-10	9,7E-10	1,3E-09	1,9E-09	2,8E-09	2,0E-08
	razón	1,00	0,69	0,88	0,85	1,34	1,72	2,56	3,88	27,41
	%	100%	145%	113%	117%	75%	58%	39%	26%	4%
00018	CI50	5,7E-10	5,5E-10	6,9E-10	1,2E-09	2,8E-09	9,5E-09	3,2E-08	4,2E-08	6,2E-07
	razón	1,00	0,97	1,22	2,19	4,96	16,68	55,58	73,79	1097,18
	%	100%	103%	82%	46%	20%	6%	2%	1%	0%
00019	CI50	5,0E-10	4,7E-10	4,5E-10	9,1E-10	7,2E-10	1,7E-09	3,0E-09	5,2E-09	4,1E-08
	razón	1,00	0,93	0,89	1,81	1,43	3,36	6,02	10,32	82,22
	%	100%	108%	112%	55%	70%	30%	17%	10%	1%

Basándose en los resultados con fluidos derivados de los diferentes compartimientos del SHIME, la evaluación de la estabilidad permite una clasificación de los Nanobodies que representa la estabilidad en todos los compartimientos GI: 00015 > 00019 > 00018.

Conjuntamente, la eliminación de los sitios de escisión de proteasas parece no tener un efecto positivo, tal como sobre la estabilidad y sensibilidad a proteasas de esta familia de Nanobodies. La introducción de las mutaciones anti-PEA L11V y V89L en A16600015 parece tener un efecto negativo sobre la estabilidad de este Nanobody particular.

Ejemplo 6: Variantes estabilizadas

Puesto que la eliminación de los sitios de escisión de proteasas no dio como resultado los resultados anticipados, los inventores se dispusieron adicionalmente a elaborar variantes anti-TNF-α, que serían inherentemente más estables pero en las que la humanización y las mutaciones anti-PEA no se vieron comprometidas preferiblemente. Esto requirió un enfoque no convencional en vista de los diversos residuos de aminoácido que presentan características mutuamente excluyentes, tales como humanización frente a estabilidad a proteasas frente a afinidad.

6.1 Enlace de cisteínas internas y eliminación del sitio de escisión de quimotripsina de CDR3

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

Además, los inventores plantearon la hipótesis de que podrían diseñarse por ingeniería genética variantes que serían inherentemente estables por medio de la introducción de un enlace disulfuro dentro del dominio (véase Wozniak-Knopp *et al.* 2012 PLoS One. 2012; 7(1): e30083). Esto requeriría la introducción de dos residuos de

cisteínas que entonces se aparearían formando una cistina. Tras resolver la estructura proteica del Nanobody y su interacción con el TNF- α diana por medio de estudios de cristalización (datos no mostrados), los inventores decidieron mutar las mutaciones S49C y I69C de aminoácidos para introducir un enlace disulfuro dentro del dominio, aunque el residuo de aminoácido S49 es adyacente a CDR2, y se introdujo en vista de fines de humanización (correspondiente a DP51 de línea germinal humana, véase el ejemplo 2). La nueva variante que comprende S49C, I69C y Y100dL se denomina A016600052 (SEQ ID NO: 63).

Con el fin de evaluar la influencia de la posición de aminoácido 49 en profundidad, se mutó este residuo de aminoácido a una alanina. De manera notable, esta mutación en la posición 49 correspondería a la IgHV3-IgHJ de línea germinal humana, aunque diferente. Todas las nuevas variantes A016600046 (SEQ ID NO: 62), A016600016 (SEQ ID NO: 36), A016600020 (SEQ ID NO: 39) y A016600021 (SEQ ID NO: 40) comprenden A49.

Además, en la variante A016600020 (SEQ ID NO: 39) se evaluaron las posiciones D60A, E61D y P62S en vista de la estabilidad física. Los residuos de aminoácido A60, D61 y S62 están ubicados adyacentes al sitio de escisión de quimotripsina confirmado experimentalmente Y58 y dentro de la CDR2 según Kabat, lo que implica un alto riesgo de pérdida de potencia.

Además, se introdujo accidentalmente un sitio de escisión de proteasas mediante la mutación humanizante Q75K. Sin querer restringirse a la teoría, los inventores plantearon la hipótesis de que el cambio del residuo de aminoácido ubicado de manera adyacente A74S afectaría posiblemente a tanto la humanización así como a la sensibilidad a proteasas, pero solo hasta un grado, es decir se esperaba que tanto la humanización como la sensibilidad a proteasas disminuyeran hasta un grado aceptable. Las variantes que comprenden S74 son A016600016 ("00016"), A016600020 ("00020"), A016600021 ("00021"), A016600046 ("00046") y A016600052 ("00052") (SEQ ID NO: 36, 39, 40, 62 y 63, respectivamente). La variante de comparación era A016600038 ("00038"; SEQ ID NO: 64), que es idéntica a A016600021 (SEQ ID NO: 40), pero con 74S en lugar de 74A.

Las secuencias resultantes se proporcionan en la figura 3.

6.2 Características de variantes estabilizadas

A continuación, se evaluaron estas variantes para determinar diversas características, esencialmente tal como se expuso en los ejemplos 3 y 4.

En un primer caso, se determinó la producción de las variantes 00016, 00020 y 00021 en *P. pastoris* según el ejemplo 1.

En la tabla 6.2A se proporciona un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 6.2A

Nanobody	L11	S49	D60	E61	P62	A74	L78	V89	Cantidad (µg)	Tm a pH 7 (°C)	Estabilidad en fluido GI (clasificación)
A016600021	V	A	.	.	.	S	V	L	332	65	1
A016600016	V	A	.	.	.	S	.	L	499	65	2
A016600020	V	A	A	D	S	S	V	L	374	75	3

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

A continuación, se determinó la estabilidad térmica de estas variantes según el ejemplo 4.3. En la tabla 6.2A también se proporciona un resumen de los resultados obtenidos.

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

Inesperadamente, el residuo de aminoácido A49 obvia la influencia de los residuos de aminoácido anti-PEA V11 y L89 sobre la producción y estabilidad.

Se evaluaron diversas variantes del ejemplo 6.1 conjuntamente en los fluidos GI derivados del modelo de SHIME según el ejemplo 5.

En la tabla 6.2B se proporciona un resumen de la actividad resultante al final del periodo de incubación en diversas

condiciones de A016600021, A016600038, A016600046 y A016600052. La incubación en PBS confirmó la estabilidad inherente de los Nanobodies (datos no mostrados).

Tabla 6.2B	C/CO frente al tiempo en h							
	Colon A con CD	Colon D con CD	Colon T con CD	SI en ayunas*	SI con alimentación*	Colon A con UC2	Colon D con UC2	Colon T con UC2
A016600021	66	58	76	65	31	86	57	71
A016600038	48	41	47	60	33	77	50	59
A016600046	47	29	62	52	24	92	59	≥100
A016600052	41	49	40	ND	ND	64	43	55
A016600039	38	26	39	23	20	78	20	55
A016600040	38	40	19	67	24	91	83	63
A016600045	85	≥100	49	60	26	68	41	≥100

5 *con enfermedad; ND es no determinado; CD es enfermedad de Crohn; UC es colitis ulcerosa

10 Las variantes A016600046 Y100dL (SEQ ID NO: 62) en las que se eliminó un sitio de escisión de proteasa y la variante A016600052 (SEQ ID NO: 63), que se estabilizó adicionalmente por medio de un enlace de cisteínas dentro del dominio no proporcionaron ninguna mejora en este sentido. De manera notable, la CI50 de las variantes 00046 y 00052 aumentó 2-5 veces en comparación con 00021 (1,13 nM y 3,56 nM, respectivamente en comparación con 0,67 nM) debido a la mutación en CDR3.

15 Los resultados de SHIME confirmaron esencialmente y extendieron los resultados de la Tm y la producción. Además, el modelo de SHIME reveló que la variante 00021 (SEQ ID NO: 40) es de manera sistemática más estable que la variante A016600040 ("00040"; SEQ ID NO: 67) y la variante 00038 (SEQ ID NO: 64), lo que es indicativo de la contribución positiva de una serina en la posición 74.

20 De manera notable, la variante A016600039 (SEQ ID NO: 68) que es idéntica a la variante 00040 (SEQ ID NO: 67) excepto por A74S, mostró que S74 era sistemáticamente menos estable que A74 en el modelo de SHIME.

25 Basándose en todos los resultados, incluyendo los resultados con fluidos derivados de los diferentes compartimientos de SHIME, una evaluación de la estabilidad global permite una clasificación de los Nanobodies que representa la estabilidad en todos los compartimientos GI: 00021 > 00016 > 00020 > 00040 > 00015 > 00019 > 00018.

30 Por tanto, las mutaciones anti-PEA L11V y V89L en A16600015 parecen tener un efecto negativo sobre la estabilidad de este Nanobody particular, que pudo aliviarse por 49A, pero no por 49C-69C. Además, en Nanobodies que comprenden las mutaciones anti-PEA L11V y V89L, el residuo de aminoácido 74S era beneficioso para la estabilidad en el modelo de SHIME.

30 6.3 A016600021 tiene características favorables (con respecto a A016600039 y A016600040)

35 Para la administración oral se cree que puede requerirse una alta dosificación junto a la estabilidad. Con el fin de tener costes aceptables, el candidato se produce preferiblemente a altas cantidades, se purifica sin pérdida considerable y se formula a una alta concentración. Por tanto, los inventores exponen experimentos para someter a prueba estos parámetros.

40 En primer lugar, los inventores se dispusieron a comparar los niveles de expresión de A016600039 y A016600040 con A016600021.

40 Tal como puede observarse en la figura 11A, la expresión de A016600039 (SEQ ID NO: 68) era considerablemente inferior a los niveles de expresión de A016600021 (SEQ ID NO: 40) y A016600040 (SEQ ID NO: 67). Estos resultados se cuantificaron también por medio de AKTAmicro, de los cuales se representan los resultados en la tabla 6.3.

45 Tabla 6.3

Clon	Aktam de rendimiento (g/l de medio libre de células)
A016600021	6,3
A016600039	0,49
A016600040	2,3

50 Con respecto a la capacidad de fabricación de A016600021 frente a A016600040, ambas se sometieron a prueba con respecto a la solubilidad máxima durante la concentración del caldo de fermentación. La solubilidad máxima en el caldo de fermentación clarificado es de sólo 30 g/l para A016600040 (frente a >75 g/l para A016600021). Además,

se encontraron pérdidas importantes durante la purificación adicional de A016600040.

Por tanto, además de la estabilidad, A016600021 tiene también, inesperadamente, características de producción y purificación favorables con respecto a A016600039 y A016600040.

Basándose en las características de estabilidad, expresión y purificación ventajosas, los inventores se centraron en A016600021, cuya solubilidad se determinó. Para completa sorpresa de los inventores, A016600021 era soluble hasta unos sin precedentes 200 mg/ml en H₂O.

Ejemplo 7: Las variantes estabilizadas superan a las referencias

Se evaluaron las variantes A016600021 (SEQ ID NO: 40), A016600038 (SEQ ID NO: 64) y A016600045 (SEQ ID NO: 69) para determinar su unión a TNF humano unido a la membrana (mTNF) en un ensayo de competición con Enbrel (Etanercept), un agente terapéutico anti-TNF basado en TNF-R2. Para ello se generó una línea celular que expresaba de manera estable una forma que no podía escindir de TNF humano mediante transfección de células HEK293H con un vector de expresión eucariota que codificaba para la variante R77T/S78T de TNF humano (denominada HEK293H-mTNF), tal como se describió anteriormente (Harashima *et al.*, 2001 J Immunol 166:130-136). Tras la selección mediante coexpresión del gen de resistencia a puomicina, se realizó la clasificación de las células individuales que expresaban mTNF por medio de FACS (BD FACS Aria) tras la tinción de las células con Remicade (infliximab) y F(ab')₂ de cabra secundario anti-IgG humana, ads-PE de ratón. Se confirmó la expresión constitutiva de TNF unido a la membrana en los clones individuales seleccionados mediante citometría de flujo (BD FACS Array).

En un primer caso, se evaluó la unión de Enbrel a mTNF en estas células. Para ello, se sembraron 5.10⁵ células de un único clon de HEK293H-mTNF en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron directamente con diferentes concentraciones de Enbrel diluidos en tampón de FACS (PBS complementado con FBS al 10% y azida de sodio al 0,05%) durante 90 minutos a 4°C. Se lavaron las células con tampón de FACS y se tiñeron con anticuerpos F(ab')₂ de cabra secundario anti-IgG humana, ads-PE de ratón durante 30 minutos a 4°C. Tras el lavado y la incubación de las células en el tampón de FACS en presencia de la cepa muerta TO-PRO-3 iodide, se midió la unión de Enbrel a mTNF en células HEK293H-mTNF viables mediante lectura en BD FACS Array. A partir de la curva de respuesta a la dosis obtenida, se definió que los valores de CE30 y CE90 de Enbrel para la unión a mTNF eran respectivamente de 0,02 nM y 0,2 nM. Ambas concentraciones se aplicaron posteriormente en el ensayo de competición con Nanobodies dirigidos a TNF.

Para evaluar la unión a mTNF de A016600021, A016600038 y A016600045, se estableció un experimento de competición con Enbrel a concentraciones de CE30 y CE90 fijadas. Se comparó la potencia de Nanobodies anti-TNF con el compuesto de referencia Cimzia (certolizumab pegol). Adicionalmente, se incluyó un Nanobody irrelevante (IRR00027) como control negativo. En este ensayo, se aplicaron condiciones idénticas a las descritas anteriormente para la unión a Enbrel, excepto por la primera etapa de incubación que en este experimento implica cotratamiento de las células con una concentración fijada de Enbrel (CE30 o CE90) en combinación con diferentes concentraciones de los Nanobodies anti-TNF o Cimzia que oscilan entre 300 nM y 12,5 pM. La lectura en BD FACS Array determinó la unión de Enbrel en células HEK293H-mTNF que se redujo claramente tras el cotratamiento con concentraciones crecientes de Nanobodies así como con Cimzia, indicando competición de los agentes anti-TNF con Enbrel por la unión a mTNF. Se determinaron los valores de CI50 de los agentes anti-TNF tal como se indica en la tabla 7.

Tabla 7	Enbrel (CE30: 0,02 nM)	Enbrel (CE90: 0,2 nM)
A016600021	0,43 nM	0,65 nM
A016600038	0,43 nM	0,70 nM
A016600045	0,54 nM	0,76 nM
Cimzia	7,9 nM	4,8 nM

Los resultados obtenidos demuestran que A016600021, A016600038 y A016600045 tienen una potencia 6-7 veces mejor que Cimzia a CE90 y una impresionante potencia 15-18 veces mejor que Cimzia a CE30. Las variantes estabilizadas tienen una potencia comparable para competir con Enbrel por la unión a mTNF.

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

ES 2 662 418 T3

Tabla A: Referencia A y sus CDR y PMP6C11

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
58	NC55TNF-NC7 (PMP6C11). WO06/122786: SEQ ID NO: 125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGR EFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQN TVYLQMDSLKPED TAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
59	WO2015/173325 SEQ ID NO: 345	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR EFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPED TALYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
1	Referencia A:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR EFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
2	CDR1 (Kabat)	TADMG
3	CDR2 (Kabat)	RISGIDGTTYDEPVKG
4	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
5	CDR1 (Abm)	GFTFSTADMG
6	CDR2 (Abm)	RISGIDGTTY
7	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
Nota: SEQ ID NO:4 es idéntica a SEQ ID NO: 7		

Tabla B: Posibles combinaciones de aminoácidos en las posiciones 11, 89, 110 y 112.

		POSICIÓN						POSICIÓN				
		11	89	110	112			11	89	110	112	
COMBINACION		<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	COMBINACION		V	T	T	S	
		L	T	T	K			V	T	T	K	
		L	T	T	Q			V	T	T	Q	
		L	T	K	S			V	T	K	S	
		L	T	Q	S			V	T	Q	S	
		L	V	T	K			V	V	T	K	
		L	V	T	Q			V	V	T	Q	
		L	V	K	S			V	V	K	S	
		L	V	Q	S			V	V	Q	S	
								<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	
		L	L	T	K			<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	
		L	L	T	Q			<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	
		L	L	K	S			<u>V</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	
		L	L	Q	S			<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	

Tabla B-1: Posibles combinaciones de aminoácidos en las posiciones 11, 89, 110, 112, 49 y 74.

COMBINACIÓN						POSICIÓN					
11	89	110	112	74		11	89	110	112	74	
L	T	T	S	S		L	T	T	S	S	
L	T	T	K	S		L	T	T	K	S	
L	T	T	Q	S		L	T	T	Q	S	
L	T	K	S	S		L	T	K	S	S	
L	T	Q	S	S		L	T	Q	S	S	
L	V	T	K	S		L	V	T	K	S	
L	V	T	Q	S		L	V	T	Q	S	
L	V	K	S	S		L	V	K	S	S	
L	V	Q	S	S		L	V	Q	S	S	
L	L	T	K	S		L	L	T	K	S	
L	L	T	Q	S		L	L	T	Q	S	
L	L	K	S	S		L	L	K	S	S	
L	L	Q	S	S		L	L	Q	S	S	

COMBINACIÓN						POSICIÓN					
11	89	110	112	49		11	89	110	112	49	
L	T	T	S	A		L	T	T	S	A	
L	T	T	K	A		L	T	T	K	A	
L	T	T	Q	A		L	T	T	Q	A	
L	T	K	S	A		L	T	K	S	A	
L	T	Q	S	A		L	T	Q	S	A	
L	V	T	K	A		L	V	T	K	A	
L	V	T	Q	A		L	V	T	Q	A	
L	V	K	S	A		L	V	K	S	A	
L	V	Q	S	A		L	V	Q	S	A	
L	L	T	K	A		L	L	T	K	A	
L	L	T	Q	A		L	L	T	Q	A	
L	L	K	S	A		L	L	K	S	A	
L	L	Q	S	A		L	L	Q	S	A	

COMBINACIÓN						POSICIÓN					
11	89	110	112	49	74	11	89	110	112	49	74
L	T	T	S	A	S	L	T	T	S	A	S
L	T	T	K	A	S	L	T	T	K	A	S
L	T	T	Q	A	S	L	T	T	Q	A	S
L	T	K	S	A	S	L	T	K	S	A	S
L	T	Q	S	A	S	L	T	Q	S	A	S
L	V	T	K	A	S	L	V	T	K	A	S
L	V	T	Q	A	S	L	V	T	Q	A	S
L	V	K	S	A	S	L	V	K	S	A	S
L	V	Q	S	A	S	L	V	Q	S	A	S
L	L	T	K	A	S	L	L	T	K	A	S
L	L	T	Q	A	S	L	L	T	Q	A	S
L	L	K	S	A	S	L	L	K	S	A	S
L	L	Q	S	A	S	L	L	Q	S	A	S

Tabla B-2: Posibles combinaciones de aminoácidos en las posiciones 11, 89, 110, 112, 49 y 74.

COMBINACIÓN						POSICIÓN			
11	89	110	112	74					
V	T	T	S	S					
V	T	T	K	S					
V	T	T	Q	S					
V	T	K	S	S					
V	V	T	K	S					
V	V	T	Q	S					
V	V	K	S	S					
V	V	Q	S	S					
V	L	T	S	S					
V	L	T	K	S					
V	L	T	Q	S					
V	L	K	S	S					
V	L	Q	S	S					
V	T	Q	S	S					

COMBINACIÓN						POSICIÓN			
11	89	110	112	49					
V	T	T	S	A					
V	T	T	K	A					
V	T	T	Q	A					
V	T	K	S	A					
V	V	T	K	A					
V	V	T	Q	A					
V	V	K	S	A					
V	V	Q	S	A					
V	L	T	S	A					
V	L	T	K	A					
V	L	T	Q	A					
V	L	K	S	A					
V	L	Q	S	A					
V	T	Q	S	A					

COMBINACIÓN						POSICIÓN			
11	89	110	112	49	74				
V	T	T	S	A	S				
V	T	T	K	A	S				
V	T	T	Q	A	S				
V	T	K	S	A	S				
V	V	T	K	A	S				
V	V	T	Q	A	S				
V	V	K	S	A	S				
V	V	Q	S	A	S				
V	L	T	S	A	S				
V	L	T	K	A	S				
V	L	T	Q	A	S				
V	L	K	S	A	S				
V	L	Q	S	A	S				
V	T	Q	S	A	S				

Tabla C-1: Representación esquemática de algunos compuestos de la invención sin un ISVD que prolonga la semivida.

[Agente de unión a TNF de la invención]
[Agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[agente de unión a TNF de la invención]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[TNF2]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[TNF2]-X(n)
[TNF2]-[agente de unión a TNF de la invención]
[TNF2]-[agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[unidad de direccionamiento]
[Unidad de direccionamiento]-[agente de unión a TNF de la invención]-
[Agente de unión a TNF de la invención]-[unidad de direccionamiento]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[agente de unión a TNF de la invención]-[unidad de direccionamiento]-X(n)
Leyenda: - “[Agente de unión a TNF de la invención]” representa un agente de unión a TNF de la invención - “-” Representa o bien una unión covalente directa o bien un ligador adecuado, tal como un ligador 9GS, 15GS o 35GS - “X(n)” representa una extensión C-terminal tal como se define en el presente documento tal como un único residuo de alanina. - “[TNF2]” representa un dominio de unión o una unidad de unión (y en particular ISVD) contra TNF diferente del agente de unión a TNF de la invención. - “[Unidad de direccionamiento]” representa un dominio de unión o una unidad de unión (y en particular ISVD) que dirige el compuesto de la invención a una célula, un tejido o un órgano específico.

Tabla C-2: Representación esquemática de algunos compuestos de la invención con un ISVD que prolonga la semivida.

[Agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]
[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]
[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]-[agente de unión a TNF de la invención]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]-[agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[TNF2]-[HLE]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-[TNF2]
[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]-[TNF2]
[HLE]-[TNF2]-[agente de unión a TNF de la invención]
[TNF2]-[agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]
[TNF2]-[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[TNF2]-[HLE]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-[TNF2]-X(n)
[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]-[TNF2]-X(n)
[HLE]-[TNF2]-[agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[TNF2]-[agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-X(n)
[TNF2]-[HLE]-[agente de unión a TNF de la invención]-X(n)
[Agente de unión a TNF de la invención]-[unidad de direccionamiento]-[HLE]
[Unidad de direccionamiento]-[agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]
[Agente de unión a TNF de la invención]-[unidad de direccionamiento]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[unidad de direccionamiento]-[agente de unión a TNF de la invención]-[HLE]-X(n)
Leyenda: - “[Agente de unión a TNF de la invención]” representa un agente de unión a TNF de la invención - “-” Representa o bien una unión covalente directa o bien un ligador adecuado, tal como un ligador 9GS, 15GS o 35GS - “X(n)” representa una extensión C-terminal tal como se define en el presente documento tal como un único residuo de alanina. - “[HLE]” representa un dominio de unión o una unidad de unión que prolonga la semivida (y en particular un ISVD que prolonga la semivida), tal como un ISVD (y en particular Nanobody) contra albúmina sérica (humana);

- “[TNF2]” representa un dominio de unión o una unidad de unión (y en particular ISVD) contra TNF diferente del agente de unión a TNF de la invención.
 - “[Unidad de direccionamiento]” representa un dominio de unión o una unidad de unión (y en particular ISVD) que dirige el compuesto de la invención a una célula, un tejido o un órgano específico.

Tabla D: Secuencias de ISVD que se unen a albúmina sérica (“ID” se refiere a la SEQ ID NO tal como se usa en el presente documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Alb8	70	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb23	71	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNASKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb129	72	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Alb132	73	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNASKNTLYLQMNLSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Alb11	74	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	75	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVKVSSA
Alb82	76	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb82-A	77	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Alb82-AA	78	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSAA
Alb82-AAA	79	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSAAA
Alb82-G	80	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSG
Alb82-GG	81	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGG
Alb82-GGG	82	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGG
Alb92	83	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNASKNTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Alb223	84	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNASKNTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA

ES 2 662 418 T3

Tabla E: Diversas secuencias de aminoácidos (“ID” se refiere a la SEQ ID NO tal como se usa en el presente documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Ligador 5GS	85	GGGGS
Ligador 7GS	86	SGGS
Ligador 8GS	87	GGGGCGGGS
Ligador 9GS	88	GGGGS
Ligador 10GS	89	GGGGS
Ligador 15GS	90	GGGSGGGSGGGGS
Ligador 18GS	91	GGGSGGGSGGGGGGS
Ligador 20GS	92	GGGSGGGSGGGSGGGGS
Ligador 25GS	93	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Ligador 30GS	94	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Ligador 35GS	95	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Ligador 40GS	96	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
Bisagra G1	97	EPKSCDKTHTCPPCP
Bisagra 9GS-G1	98	GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
Región de bisagra larga superior de llama	99	EPKTPKPQAAA
Bisagra G3	100	ELKTPKPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRC

Lista de secuencias

<110> ABLYNX NV

5 <120> AGENTES DE UNIÓN A TNF MEJORADOS

<130> 192557

<150> Documento US62/254375

10 <151> 12-11-2015

<160> 105

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Asp	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Arg	Glu	Phe	Val
		35					40					45			
Ser	Arg	Ile	Ser	Gly	Ile	Asp	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Pro	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Arg	Ser	Pro	Arg	Tyr	Ala	Asp	Gln	Trp	Ser	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

Thr Ala Asp Met Gly
1 5

5 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de CDR

<400> 3
Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de CDR

<400> 4
Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de CDR

<400> 5
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala Asp Met Gly
1 5 10

35 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de CDR

<400> 6
Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr
1 5 10

45 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de CDR

55 <400> 7

ES 2 662 418 T3

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 121
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de CDR

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 11

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser
115 120

<210> 12

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 12

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115 120

<210> 13

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 13

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

10

<400> 14

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115 120

<210> 15

<211> 121

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 15

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser
115 120

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 16

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115 120

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

10

<400> 17

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 662 418 T3

<223> Secuencia de CDR

<400> 18

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
115 120

5

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 19

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

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

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

15

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de CDR

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser
115 120

<210> 21
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 21

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115 120

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 22

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 23
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de CDR

10

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 24
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 24

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 25

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 25

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
115 120

<210> 26

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 26

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 27

15 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 27

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 28

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 29

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 29

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
115 120

<210> 30

15 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 30

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 31

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 32
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de CDR

10

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 33
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 33

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 34

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
115 120

<210> 35

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 35

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 36

15 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 37

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 37

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 38

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 38

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 39

15 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 39

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 40

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

15 <400> 40

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

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

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

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

ES 2 662 418 T3

50

55

60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de CDR

<400> 41

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 42

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 662 418 T3

<220>

<223> Etiqueta de HIS6-FLAG3

<400> 42

His His His His His His Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly
20 25 30

5 Ala Ala

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Extremo C-terminal

15 <400> 43

Val Thr Val Lys Ser
1 5

<210> 44

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Extremo C-terminal

25

<400> 44

Val Thr Val Gln Ser
1 5

<210> 45

30 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Extremo C-terminal

<400> 45

Val Lys Val Ser Ser
1 5

40 <210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Extremo C-terminal

<400> 46

Val Gln Val Ser Ser
1 5

50

<210> 47

<211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Extremo C-terminal

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)..(6)
 10 <223> Xaa representa (X)n que significa extensión C-terminal con n aminoácidos, en la que cada posición se elige independientemente de cualquier aminoácido

<400> 47
Val Thr Val Lys Ser Xaa
 1 5

15 <210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Extremo C-terminal

<220>
 25 <221> SITIO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa (X)n que significa extensión C-terminal con n aminoácidos, en la que cada posición se elige independientemente de cualquier aminoácido

30 <400> 48
Val Thr Val Gln Ser Xaa
 1 5

<210> 49
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Extremo C-terminal

40 <220>
 <221> SITIO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa (X)n que significa extensión C-terminal con n aminoácidos, en la que cada posición se elige independientemente de cualquier aminoácido

45 <400> 49
Val Lys Val Ser Ser Xaa
 1 5

50 <210> 50
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Extremo C-terminal

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)..(6)
 60 <223> Xaa representa (X)n que significa extensión C-terminal con n aminoácidos, en la que cada posición se elige independientemente de cualquier aminoácido

<400> 50
Val Gln Val Ser Ser Xaa
 1 5

5 <210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Extremo C-terminal

<400> 51
Val Thr Val Lys Ser Ala
 1 5

15 <210> 52
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Extremo C-terminal

<400> 52
Val Thr Val Gln Ser Ala
 1 5

25 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Extremo C-terminal

35 <400> 53
Val Lys Val Ser Ser Ala
 1 5

40 <210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Extremo C-terminal

<400> 54
Val Gln Val Ser Ser Ala
 1 5

50 <210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Extremo C-terminal

<400> 55
Val Thr Val Ser Ser
 1 5

60

<210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Extremo C-terminal
 <220>
 10 <221> SITIO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa (X)n que significa extensión C-terminal con n aminoácidos, en la que cada posición se elige independientemente de cualquier aminoácido
 <400> 56
Val Thr Val Ser Ser Xaa
1 5
 <210> 57
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Extremo C-terminal
 25 <400> 57
Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5
 <210> 58
 30 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Secuencia de CDR
 <400> 58

ES 2 662 418 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 59
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de CDR

10 <400> 59

ES 2 662 418 T3

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 121
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de CDR

<400> 60
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

ES 2 662 418 T3

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de CDR

<400> 61
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 62
15 <211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 62

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 63

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 63

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

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

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

Cys Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

ES 2 662 418 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 64

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 64

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 65

15 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 65

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Arg Pro Ser Gln Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 66

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

ES 2 662 418 T3

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

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

Arg Pro Ser Gln Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 67

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68

15 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 69

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

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

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

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

ES 2 662 418 T3

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala His Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 70

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia de CDR

<400> 70

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 71

15 <211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

- 5 <210> 72
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de CDR

<400> 72

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

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

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

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

ES 2 662 418 T3

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

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

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

Val Ser Ser Ala
115

<210> 73
<211> 116
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de CDR

<400> 73
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala
115

<210> 74
15 <211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

- 5 <210> 75
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de CDR

<400> 75

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

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

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

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

ES 2 662 418 T3

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

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

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

Val Ser Ser Ala
115

<210> 76
<211> 115
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de CDR

<400> 76
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 77
15 <211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala
115

<210> 78

5 <211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de CDR

<400> 78

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

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

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

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

ES 2 662 418 T3

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ala
115

<210> 79

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia de CDR

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ala Ala
115

<210> 80

15 <211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Gly
115

- 5 <210> 81
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de CDR

<400> 81

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

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

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

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

ES 2 662 418 T3

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

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

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

Val Ser Ser Gly Gly
115

<210> 82
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de CDR

<400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Gly Gly Gly
115

<210> 83
15 <211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de CDR

ES 2 662 418 T3

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

- 5 <210> 84
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de CDR

<400> 84

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

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

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

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

ES 2 662 418 T3

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

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

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

Val Ser Ser Ala
115

5 <210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Ligador

<400> 85
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Ligador

<400> 86
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

25 <210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Ligador

<400> 87
Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

35 <210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Ligador

<400> 88
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

45 <210> 89

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Ligador

<400> 89
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

10 <210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Ligador

<400> 90
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

20 <210> 91
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Ligador

30 <400> 91
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser

<210> 92
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Ligador

40 <400> 92
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

45 <210> 93
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Ligador

<400> 93

ES 2 662 418 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

5
<210> 94
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Ligador

<400> 94
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

15
<210> 95
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Ligador

<400> 95
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

25
<210> 96
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Ligador

<400> 96
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 97

ES 2 662 418 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Bisagra G1

<400> 97
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

10 <210> 98
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Bisagra 9GS-G1

<400> 98
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 20

<210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región de bisagra larga superior de llama

30 <400> 99
 Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 100
 <211> 62
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Bisagra G3

40 <400> 100
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 50 55 60

<210> 101

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de CDR

<400> 101
Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

10 <210> 102
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de CDR

<400> 102
Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
Gly

25 <210> 103
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de CDR

<400> 103
Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5

35 <210> 104
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> TNF006C11

<400> 104

ES 2 662 418 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 105
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Etiqueta

10 <400> 105
 Gly Gly Gly Cys
 1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dominio variable individual de inmunoglobulina (ISVD) que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 40.

Figura 1

Numeración según Kabat (VH)	Numeración según Chothia (VH)	Numeración Aho	IMGT
11	11	12	12
14	14	15	15
41	41	48	46
42	42	49	47
87	87	101	99
89	89	103	101
108	108	144	---
110	110	146	---
112	112	148	---

Fuente: <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/Numbering/NumFrame.html>

Figura 2

```

                10      20      30      40
    -----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|

SEQ ID NO: 58   QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQP
SEQ ID NO: 1    E.....P.....F.F.....A
SEQ ID NO: 59   E.....V..P.....F.F.....A

                50      60      70      80
    -----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|

SEQ ID NO: 58   PGKGREFVARISGIDGTYDEPVKGRFTISRDKAQNTVYL
SEQ ID NO: 1    .....S.....N.K..L..
SEQ ID NO: 59   .....S.....N.K..L..

                90      100     110
    --abc--:-----|-----:-----|abcd-----:-----|-----

SEQ ID NO: 58   QMDSLKPEDTAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGGGTQVTVSS-
SEQ ID NO: 1    ..N..R.....L.....-
SEQ ID NO: 59   ..N..R.....L.....L.....-
    
```

Figura 3

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	referencia A:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGLVTVSS
2	CDR1 (Kabat)	TADMG
3	CDR2 (Kabat)	RISGIDGTTYDEPVKG
4	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
5	CDR1 (Abm)	GFTFSTADMG
6	CDR2 (Abm)	RISGIDGTTY
7	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
8	Referencia A (89T)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGLVTVSS
9	Referencia A (11V + 110K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGLVKVSS
10	Referencia A (11V + 110Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGLVQVSS
11	Referencia A (11V + 112K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGLVTVKS
12	Referencia A (11V + 112Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGLVTVQS

Figura 3 (continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
13	Referencia A (89L + 110K)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVKVSS
14	Referencia A (89L + 110Q)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVQVSS
15	Referencia A (89L + 112K)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLLVTVKS
16	Referencia A (89L + 112Q)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLLVTVQS
17	Referencia A (11V + 89L)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLLTVVSS
18	Referencia A (11V + 89L + 110K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVKVSS
19	Referencia A (11V + 89L + 110Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVQVSS
20	Referencia A (11V + 89L + 112K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLLVTVKS

Figura 3 (continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
21	Referencia A (11V + 89L + 112Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVQS
22	Referencia A (89T) + A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA TYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
23	Referencia A (11V + 110K) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVKVSSA
24	Referencia A (11V + 110Q) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVQVSSA
25	Referencia A (11V + 112K) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVKSA
26	Referencia A (11V + 112Q) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVQSA
27	Referencia A (89L + 110K) + A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVKVSSA
28	Referencia A (89L + 110Q) + A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRIISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVQVSSA

Figura 3 (continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
29	Referencia A (89L + 112K)+A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVKSA
30	Referencia A (89L + 112Q)+A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVQSA
31	Referencia A (11V + 89L) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
32	Referencia A (11V + 89L + 110K) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVKVSSA
33	Referencia A (11V + 89L + 110Q) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVQVSSA
34	Referencia A (11V + 89L + 112K)+A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVKSA
35	Referencia A (11V + 89L + 112Q)+A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVQSA
36	Agente de unión a TNF de la invención (00016)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
37	Agente de unión a TNF de la invención (00018)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA

Figura 3 (continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
38	Agente de unión a TNF de la invención (00019)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
39	Agente de unión a TNF de la invención (00020)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
40	Agente de unión a TNF de la invención (00021)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
41	Agente de unión a TNF de la invención (00030)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
42	Etiqueta de HIS6-FLAG3	HHHHHHGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGA
43	Extremo C-terminal	VTVKS
44	Extremo C-terminal	VTVQS
45	Extremo C-terminal	VKVSS
46	Extremo C-terminal	VQVSS
47	Extremo C-terminal	VTVKSX (n)
48	Extremo C-terminal	VTVQSX (n)
49	Extremo C-terminal	VKVSSX (n)
50	Extremo C-terminal	VQVSSX (n)
51	Extremo C-terminal	VTVKSA
52	Extremo C-terminal	VTVQSA
53	Extremo C-terminal	VKVSSA
54	Extremo C-terminal	VQVSSA
55	Extremo C-terminal	VTVSS
56	Extremo C-terminal	VTVSSX _(n)
57	Extremo C-terminal	VTVSSA
58	NC55TNF-NC7 (PMP6C11) WO2006/122786: SEQ ID NO: 125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQTNTVYLQMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
59	WO2015/173325 seq id NO: 345	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS

Figura 3 (continuación)

60	TNF200	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
61	A016600015 (TNF200A)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
62	A016600046 100dL (00046)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSALDYWGQGLVTVSSA
63	A016600052 (49C-69C + 100dL (00052)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVCRIISGIDGTTYDEPVKGRFTCSRDNKNTVYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSALDYWGQGLVTVSSA
64	A016600038 (00038)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
65	A016600013 (00013)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFLQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVQGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRPSQYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
66	A016600014 (00014)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVQGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRPSQYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
67	A016600040 (00040)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQNTVYLYQMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
68	A016600039 (00039)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKSQNTVYLYQMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
69	A016600045 (00045)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAHDYWGQGLVTVSSA

Figura 4

SEQIDNO:1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCTASGFTFS	TADMGWFRQA	PGKGRFVSR	ISGIDGTTY	60
SEQIDNO:8	60
SEQIDNO:9	V.....	60
SEQIDNO:11	V.....	60
SEQIDNO:10	V.....	60
SEQIDNO:12	V.....	60
SEQIDNO:13	60
SEQIDNO:14	60
SEQIDNO:15	60
SEQIDNO:16	60
SEQIDNO:17	V.....	60
SEQIDNO:18	V.....	60
SEQIDNO:19	V.....	60
SEQIDNO:20	V.....	60
SEQIDNO:21	V.....	60
SEQIDNO:22	V.....	60
SEQIDNO:23	V.....	60
SEQIDNO:24	V.....	60
SEQIDNO:25	V.....	60
SEQIDNO:26	V.....	60
SEQIDNO:27	60
SEQIDNO:28	60
SEQIDNO:29	60
SEQIDNO:30	60
SEQIDNO:31	V.....	60
SEQIDNO:32	V.....	60
SEQIDNO:33	V.....	60
SEQIDNO:34	V.....	60
SEQIDNO:35	V.....	60
SEQIDNO:36	D.....	V.....	A.....	60
SEQIDNO:37	D.....	V.....	60
SEQIDNO:38	D.....	V.....	60
SEQIDNO:39	D.....	V.....	A.....	60
SEQIDNO:40	D.....	V.....	A.....	60
SEQIDNO:41	D.....	V.....	60
SEQIDNO:58	Q.....	A.....	Q.S.....	P.....	60
SEQIDNO:1	DEPVKGRFTI	SRDNAKNTLY	LQMNSLRPED	TAVYYCRSPR	YADQWSAYDY	WGQGLTVTS	120
SEQIDNO:8	T.....	120
SEQIDNO:9	K.....	120
SEQIDNO:11	K.....	120
SEQIDNO:10	Q.....	120
SEQIDNO:12	Q.....	120
SEQIDNO:13	L.....	K.....	120
SEQIDNO:14	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:15	K.....	120
SEQIDNO:16	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:17	L.....	120
SEQIDNO:18	L.....	K.....	120
SEQIDNO:19	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:20	L.....	K.....	120
SEQIDNO:21	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:22	T.....	120
SEQIDNO:23	K.....	120
SEQIDNO:24	Q.....	120
SEQIDNO:25	K.....	120
SEQIDNO:26	Q.....	120
SEQIDNO:27	L.....	K.....	120
SEQIDNO:28	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:29	L.....	K.....	120
SEQIDNO:30	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:31	L.....	120
SEQIDNO:32	L.....	K.....	120
SEQIDNO:33	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:34	L.....	K.....	120
SEQIDNO:35	L.....	Q.....	120
SEQIDNO:36	S.....	L.....	120
SEQIDNO:37	S.....	L.....	120
SEQIDNO:38	S.....	V.....	L.....	120
SEQIDNO:39	ADS.....	S.....	V.....	L.....	120
SEQIDNO:40	S.....	V.....	L.....	120
SEQIDNO:41	L.....	120
SEQIDNO:58	K.Q.....	V.....	D.K.....	Q.....	120

**Figura 4
(continuación)**

SEQIDNO:1	S -	121
SEQIDNO:8	. -	121
SEQIDNO:9	. -	121
SEQIDNO:11	. -	121
SEQIDNO:10	. -	121
SEQIDNO:12	. -	121
SEQIDNO:13	. -	121
SEQIDNO:14	. -	121
SEQIDNO:15	. -	121
SEQIDNO:16	. -	121
SEQIDNO:17	. -	121
SEQIDNO:18	. -	121
SEQIDNO:19	. -	121
SEQIDNO:20	. -	121
SEQIDNO:21	. -	121
SEQIDNO:22	. A	122
SEQIDNO:23	. A	122
SEQIDNO:24	. A	122
SEQIDNO:25	. A	122
SEQIDNO:26	. A	122
SEQIDNO:27	. A	122
SEQIDNO:28	. A	122
SEQIDNO:29	. A	122
SEQIDNO:30	. A	122
SEQIDNO:31	. A	122
SEQIDNO:32	. A	122
SEQIDNO:33	. A	122
SEQIDNO:34	. A	122
SEQIDNO:35	. A	122
SEQIDNO:36	. A	122
SEQIDNO:37	. A	122
SEQIDNO:38	. A	122
SEQIDNO:39	. A	122
SEQIDNO:40	. A	122
SEQIDNO:41	. A	122
SEQIDNO:58	. -	121

Figura 5

		20		40		60	
SEQIDNO:31	EVQLVESGGG	VVQPGGSLRL	SCTASGFTFS	TADMGWFRQA	PGKGRFVSR	ISGIDGTTY	60
SEQIDNO:36	D A	60
SEQIDNO:37	D	60
SEQIDNO:38	D	60
SEQIDNO:39	D A	60
SEQIDNO:40	D A	60
SEQIDNO:41	D	60
SEQIDNO:1	L	60
		80		100		120	
SEQIDNO:31	DEPVKGRFTI	SRDNAKNTLY	LQMNSLRPED	TALYYCRSPR	YADQWSAYDY	WGQGTLLVTVS	120
SEQIDNO:36 S	120
SEQIDNO:37 S	120
SEQIDNO:38 S . V	120
SEQIDNO:39	ADS S . V	120
SEQIDNO:40 S . V	120
SEQIDNO:41	120
SEQIDNO:1 V	120

SEQIDNO:31	SA	122
SEQIDNO:36	. .	122
SEQIDNO:37	. .	122
SEQIDNO:38	. .	122
SEQIDNO:39	. .	122
SEQIDNO:40	. .	122
SEQIDNO:41	. .	122
SEQIDNO:1	. .	121

Figura 6

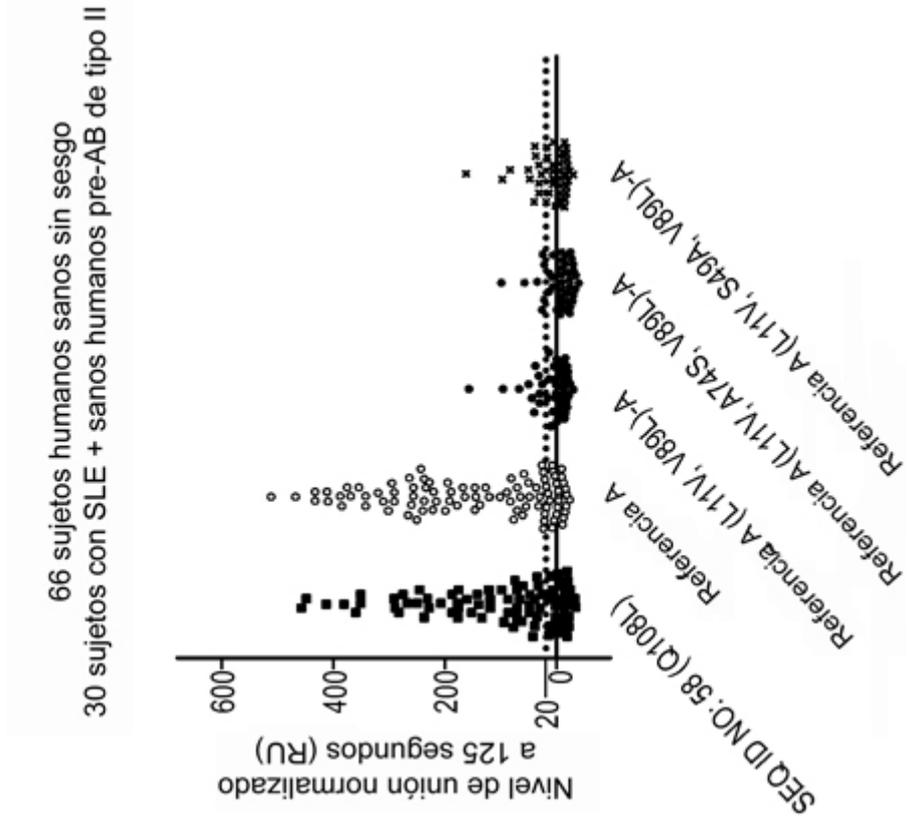
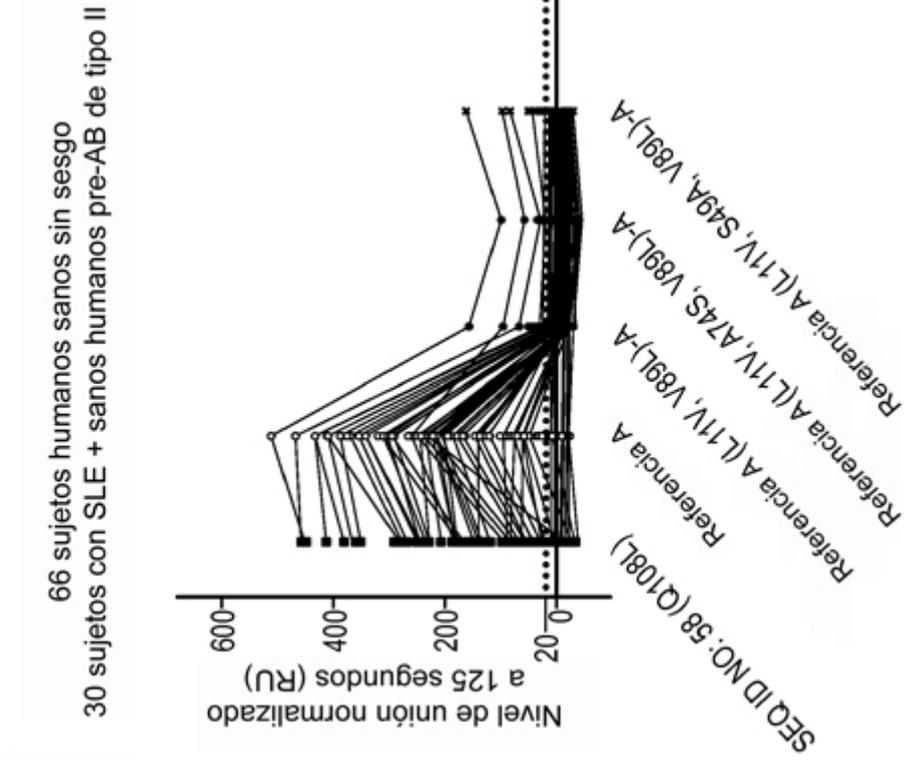


Figura 7

Muestra	Niveles de unión a PreAb normalizados (RU a 125 s)					% de reducción en la unión a PreAb en comparación con la Referencia A			
	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0042-02	-15	-11	-20	-23	-15				
IHuS#ABL-0088-03	118	200	3	-3	12	41	99	100	94
IHuS#ABL-0137-01	-17	8	-16	-22	-14				
IHuS#ABL-0138-01	-11	19	-14	-17	-17				
IHuS#ABL-0139-01	0	37	-9	-12	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0141-01	-17	-2	-15	-15	-10				
IHuS#ABL-0149-01	34	121	14	-10	32	71	88	100	73
IHuS#ABL-0150-01	11	17	-20	-19	-13				
IHuS#ABL-0151-01	38	126	-10	-16	-6	70	100	100	100
IHuS#ABL-0152-01	-2	50	-10	-12	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0153-01	61	145	-16	-23	-15	58	100	100	100
IHuS#ABL-0154-01	-32	-19	-29	-31	-25				
IHuS#ABL-0159-01	-24	-5	-28	-34	-23				
IHuS#ABL-0160-01	-15	-12	-22	-19	-12				
IHuS#ABL-0161-01	-17	-5	-11	-18	-8				
IHuS#ABL-0162-01	-15	-10	-13	-17	-17				
IHuS#ABL-0148-01	290	369	-8	-13	-10	21	100	100	100
IHuS#ABL-0163-01	236	310	4	-6	5	24	99	100	98
IHuS#ABL-0171-01	-17	-8	-21	-24	-18				
IHuS#ABL-0172-01	47	48	-18	-17	-11	0	100	100	100

Figura 7 (continuación)

Muestra	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0218-01	63	72	-12	-15	-9	13	100	100	100
IHuS#ABL-0040-03	284	342	1	-11	-7	17	100	100	100
IHuS#ABL-0090-02	413	433	25	-3	31	5	94	100	93
IHuS#ABL-0173-01	186	229	-14	-16	-13	19	100	100	100
IHuS#ABL-0188-01	-14	-8	-21	-23	-16				
IHuS#ABL-0006-02	458	468	66	34	84	2	86	93	82
IHuS#ABL-0189-01	-12	-1	-10	-13	-6				
IHuS#ABL-0190-01	-11	-3	-11	-13	-16				
IHuS#ABL-0191-01	-21	-13	-17	-19	-20				
IHuS#ABL-0192-01	-14	3	-20	-17	-15				
IHuS#ABL-0198-01	-3	8	-17	-20	-13				
IHuS#ABL-0165-01	206	240	-20	-21	-13	14	100	100	100
IHuS#ABL-0199-01	229	250	15	5	16	8	94	98	94
IHuS#ABL-0200-01	-12	12	-11	-12	-14				
IHuS#ABL-0201-01	11	30	-2	-9	-1	63	100	100	100
IHuS#ABL-0202-01	29	90	-13	-17	-9	67	100	100	100
IHuS#ABL-0044-02	-25	-23	-26	-28	-22				
IHuS#ABL-0209-01	-9	18	-15	-15	-8				
IHuS#ABL-0210-01	-10	3	-11	-13	-8				
IHuS#ABL-0211-01	2	31	-11	-13	-14	92	100	100	100
IHuS#ABL-0212-01	47	137	4	-5	5	66	97	100	97
IHuS#ABL-0213-01	-14	0	-14	-13	-11				

Figura 7 (continuación)

Muestra	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0183-01	290	353	13	-1	17	18	96	100	95
IHuS#ABL-0005-06	-18	-16	-21	-20	-16				
IHuS#ABL-0219-01	-3	7	-12	-14	-8				
IHuS#ABL-0221-01	-2	19	-20	-23	-24				
IHuS#ABL-0222-01	140	144	-11	-13	-12	3	100	100	100
IHuS#ABL-0223-01	177	267	-31	-36	-27	34	100	100	100
IHuS#ABL-0142-01	-2	25	-22	-23	-15	100	100	100	100
IHuS#ABL-0143-01	12	14	-17	-14	-7				
IHuS#ABL-0144-01	1	83	-11	-16	-8	99	100	100	100
IHuS#ABL-0145-01	87	81	-14	-16	-16	-7	100	100	100
IHuS#ABL-0146-01	16	61	-16	-17	-16	74	100	100	100
IHuS#ABL-0147-01	72	163	-24	-29	-20	56	100	100	100
IHuS#ABL-0031-04	-35	24	-18	-26	-17	100	100	100	100
IHuS#ABL-0047-02	-5	24	-27	-26	-18	100	100	100	100
IHuS#ABL-0155-01	49	65	-4	-14	0	24	100	100	100
IHuS#ABL-0156-01	26	59	-7	-11	-10	57	100	100	100
IHuS#ABL-0157-01	98	261	-4	-13	-9	63	100	100	100
IHuS#ABL-0158-01	175	222	-13	-16	-7	21	100	100	100
IHuS#ABL-0164-01	-19	-17	-19	-22	-14				
IHuS#ABL-0166-01	-19	-18	-18	-18	-11				
IHuS#ABL-0167-01	-23	237	-20	-31	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0168-01	-14	-11	-13	-14	-14				

Figura 7 (continuación)

Muestra	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0169-01	-5	21	-10	-12	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0170-01	86	242	-16	-19	-11	64	100	100	100
ABL-0041-01_C	34	77	-19	-31	-19	55	100	100	100
ABL-0053-01_C	176	302	-11	-10	-3	42	100	100	100
ABL-0054-01_C	249	293	-8	-13	-6	15	100	100	100
ABL-0045-01_C	379	434	43	21	36	13	90	95	92
ABL-0062-01_C	268	375	-7	-18	-8	29	100	100	100
ABL-0039-01_C	361	410	31	11	30	12	92	97	93
HSI#260620081nd11	450	512	156	100	161	12	70	80	69
IHuS#29Sep2011Ind14F	151	221	36	22	39	32	84	90	82
IHuS#29Sep2011Ind39F	7	167	-9	-17	-9	96	100	100	100
IHuS#29Sep2011Ind43M	32	55	-9	-14	-11	42	100	100	100
IHuS#29Sep2011Ind44F	276	412	31	12	39	33	92	97	91
IHuS#P6012314A20	76	102	-10	-12	-8	25	100	100	100
IHuS#P7012314A06	133	216	-7	-16	-4	38	100	100	100
IHuS#P7012314A12	121	191	-13	-15	-13	37	100	100	100
IHuS#ABL-0195-01	231	296	-2	-10	1	22	100	100	100
IHuS#ABL-0208-01	351	384	50	26	49	9	87	93	87
IHuS#ABL-0184-01	66	238	-4	-13	-2	72	100	100	100
NB130259-004	39	71	-12	-12	-9	44	100	100	100
IHuS#04APR2012Ind05m	74	178	0	-14	4	59	100	100	98

Figura 7 (continuación)

+ 12111Q	1Q	11	Referencia A (L11V, V89L)	I'	Referencia A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	Referencia A (L11V, V89L)	Referencia A (L11V, A74S, V89L)	Referencia A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#04APR20 12Ind06m	70	194	-4	-6	3	64	100	100	98
IHuS#04APR20 12Ind07m	41	146	3	-3	4	72	98	100	97
IHuS#04APR20 12Ind09m	70	189	2	-3	-2	63	99	100	100
IHuS#04APR20 12Ind10m	138	234	-2	-5	-2	41	100	100	100
IHuS#04APR20 12Ind03F	245	342	10	6	17	28	97	98	95
IHuS#04APR20 12Ind04F	351	387	-8	-11	-9	9	100	100	100
IHuS#04APR20 12Ind15F	174	293	40	23	47	41	86	92	84
IHuS#04APR20 12Ind27F	160	319	29	7	26	50	91	98	92
IHuS#04APR20 12Ind29F	187	256	-2	-8	-5	27	100	100	100
IHuS#04APR20 12Ind31F	118	265	96	56	97	56	64	79	63
IHuS#04APR20 12Ind40F	95	257	-31	-40	-29	63	100	100	100

Figura 8A Sitios de escisión de tripsina y quimotripsina predichos (P) y determinados experimentalmente (E)

Leyenda
 "X" Residuo sensible a proteasa

CDR

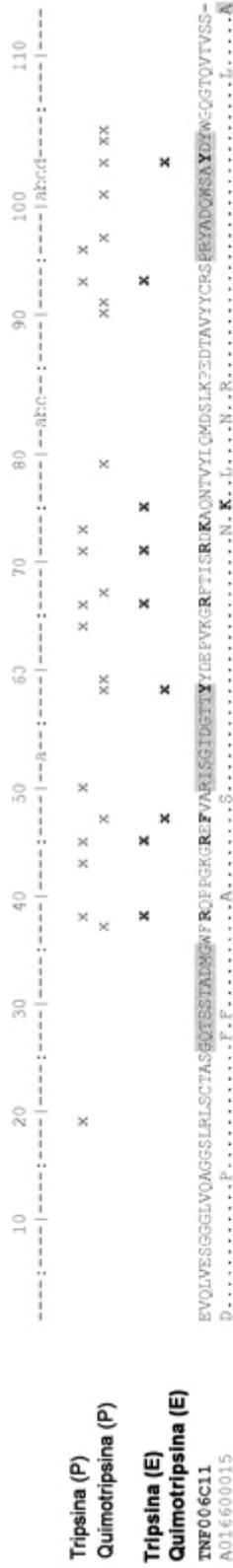


Figura 8B Análisis de A01660015 en gel de SDS PAGE teñido con Coomassie

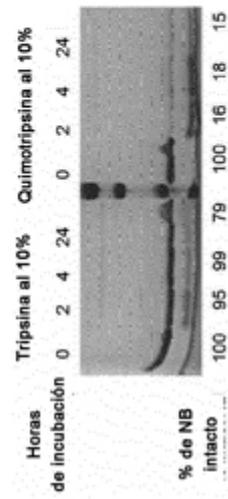
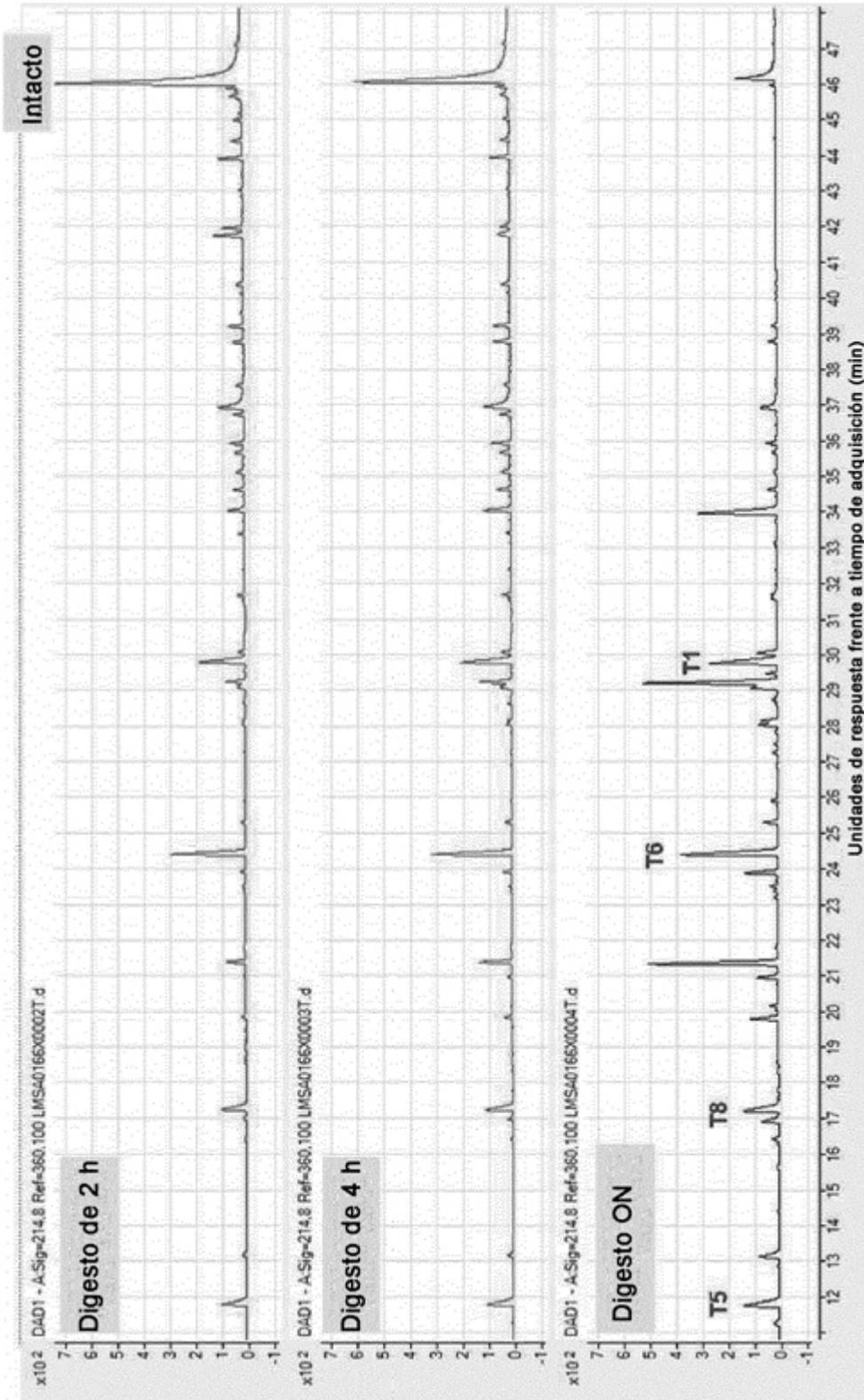


Figura 8C



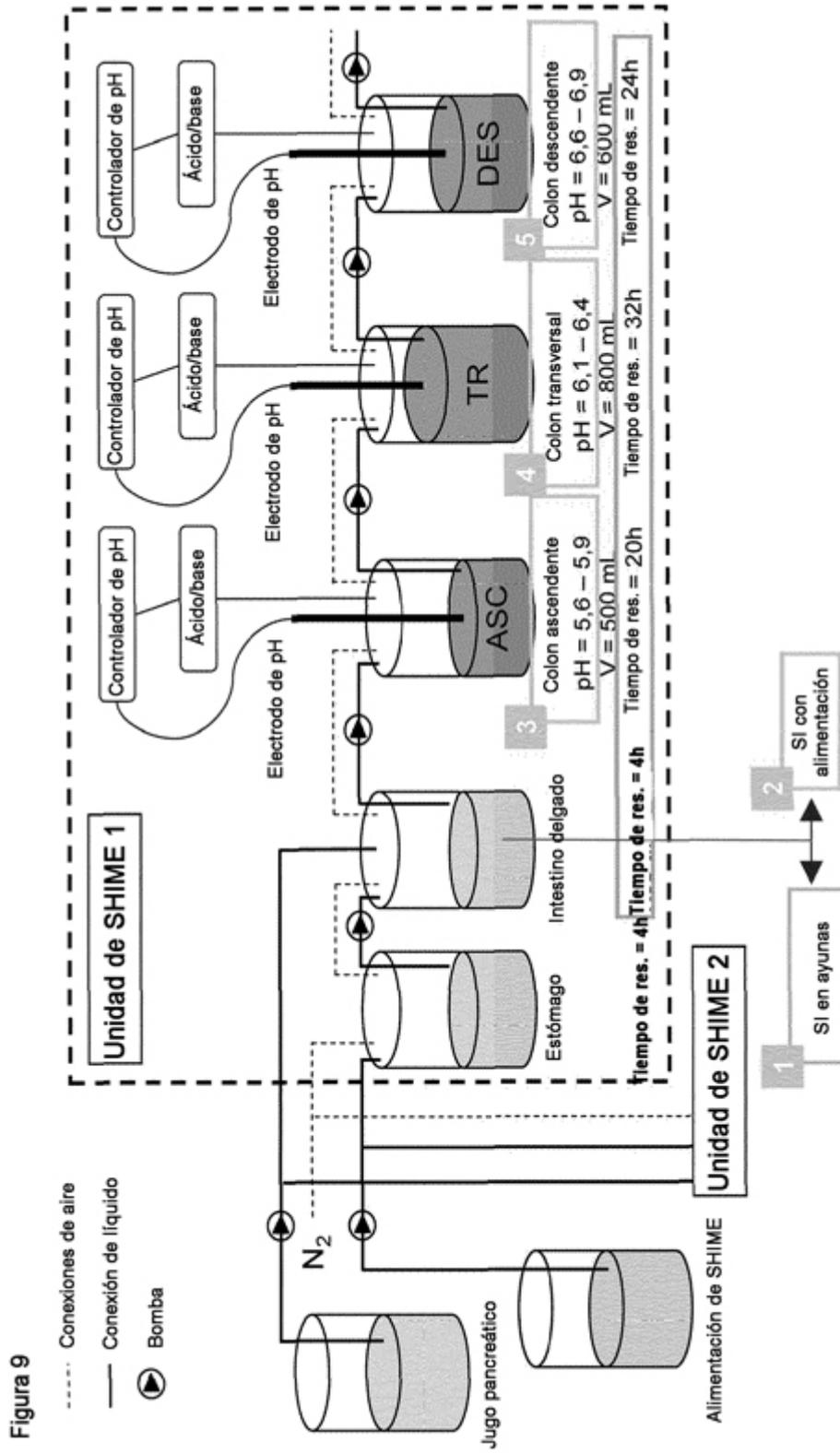
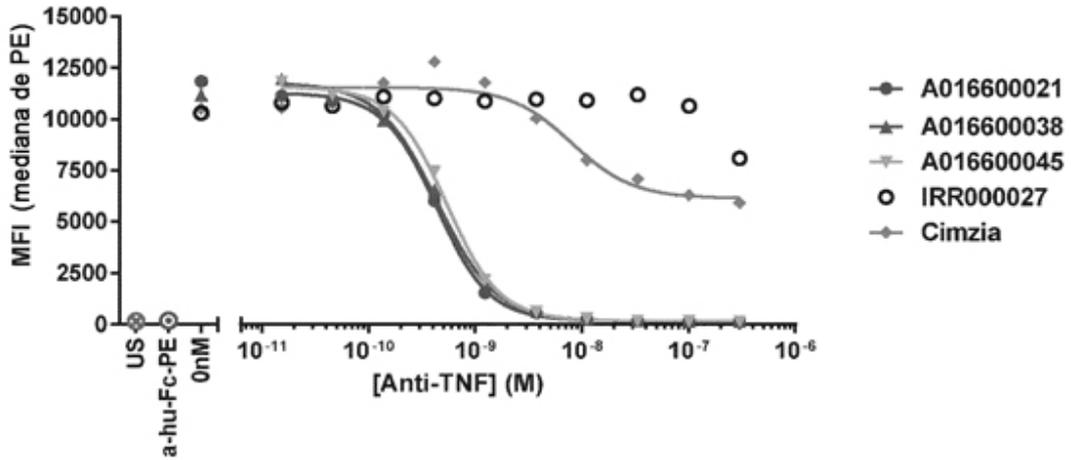


Figura 10

A

FACS de competición en células HEK293H-mTNF tratadas con Enbrel (CE[30]=0,02 nM)



B

FACS de competición en células HEK293H-mTNF tratadas con Enbrel (CE[90]=0,2 nM)

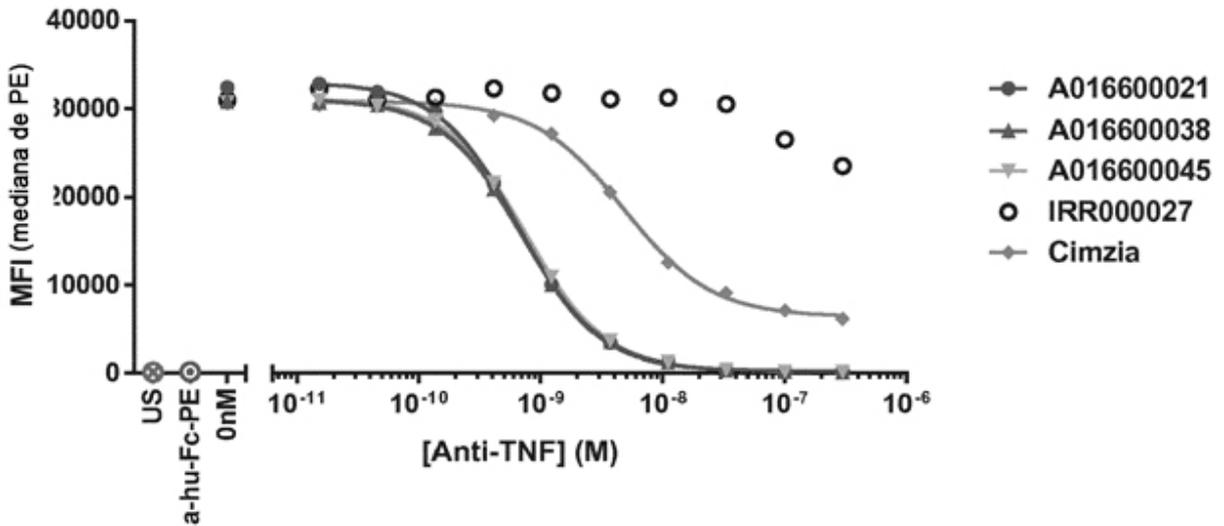


Figura 11

