

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 649**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2010 PCT/EP2010/050414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10081856**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2010 E 10700549 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2387583**

54 Título: **Administración pulmonar de dominios variables individuales de inmunoglobulina y constructos de los mismos**

30 Prioridad:

14.01.2009 US 144586 P

15.10.2009 US 251879 P

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

25.02.2019

73 Titular/es:

ABLYNX N.V. (100.0%)

Technologiepark 21

9052 Ghent-Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

BOUCHE, MARIE-PAULE LUCIENNE ARMANDA;

VANLANDSCHOOT, PETER;

SABLON, ERWIN;

DEPLA, ERIK;

DE BUCK, STEFAN;

SAELENS, XAVIER y

SCHEPENS, BERT

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 701 649 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

Administración pulmonar de dominios variables individuales de inmunoglobulina y constructos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso en un método en el que un dominio variable individual de inmunoglobulina (tal como un Nanobody) y/o constructo del mismo se absorbe en tejido pulmonar. Más particularmente, la invención proporciona una administración sistémica de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo por medio de la vía pulmonar.

Antecedentes de la técnica

15 La inhalación es una vía de administración atractiva para administrar agentes de actuación local pulmonar en enfermedades respiratorias (es decir asma, infecciones). Su uso está adoptándose también para la administración de productos terapéuticos de actuación sistémica ya sean moléculas pequeñas o macromoléculas (A. J. Bitonti y J. A. Dumont. Pulmonary administration of therapeutic proteins using an immunoglobulin transport pathway. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58:1106-1118 (2006).). Como hito de éxito, el primer polvo de insulina inhalado, Exubera®, se ha aprobado recientemente en Europa y EE. UU. para el tratamiento de pacientes adultos con diabetes tipo 1 o tipo 2 (L. Fabbri. Pulmonary safety of inhaled insulins: a review of the current data. *Curr. Med. Res. Opin.* 22 (supl. 3) 21-28 (2006).).

25 Por ejemplo, la administración sistémica de un anticuerpo convencional, cetuximab, un anticuerpo quimérico convencional que selecciona como diana el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se describe en Maillet *et al.* (Maillet *et al.* *Pharmaceutical Research*, vol. 25, n.º 6, junio de 2008). Se nebulizó cetuximab usando tres tipos de dispositivos de administración y se evaluaron las propiedades inmunológicas y farmacológicas de cetuximab. Se encontró que el anticuerpo convencional se agrega y aunque concluyen que el anticuerpo resiste a las restricciones físicas de la nebulización ya que permanece biológicamente activo, se cree que la IgG agregada no podrá captarse de manera sistémica.

35 Además, se ha sugerido un dominio variable individual de inmunoglobulina inhalado para administración pulmonar local para uso terapéutico en enfermedades del pulmón (véase, por ejemplo, el documento WO2007049017). Sin embargo, el pulmón como portal de entrada para la administración sistémica de fármacos de dominio variable individual de inmunoglobulina y en particular Nanobodies y constructo de los mismos nunca se ha descrito en detalle. La mayoría de los dominios variables individuales de inmunoglobulina para su uso como producto bioterapéutico se desarrollan solo todavía como una forma de administración de inyección intravenosa. El uso de estas formas de administración de inyección intravenosa está asociado a menudo con un bajo cumplimiento del paciente y altos costes (aplicación de la inyección a menudo solo por personal médico) en la práctica clínica. Para mejorar el cumplimiento y una aplicación rentable, el desarrollo de estrategias de administración no invasivas, fáciles de usar tales como absorción pulmonar de productos farmacéuticos, en particular productos biofarmacéuticos, por ejemplo tales como dominio variable individual de inmunoglobulina, es claramente una necesidad médica.

Sumario de la invención

45 La exposición sistémica de dominios variables individuales de inmunoglobulina tales como un Nanobody y/o constructos del mismo es a menudo corta ya que se aclaran de la circulación sistémica rápidamente. Por ejemplo, la semivida *in vivo* de un Nanobody monovalente es de aproximadamente 45 minutos en ratón (Expert Opinion on Biological Therapy, volumen 5, número 1, 1 de enero de 2005, págs. 111-124(14)). El documento EP 1517921 propone una estrategia para prolongar la exposición sistémica produciendo un constructo que comprende un dominio variable de inmunoglobulina contra un antígeno y un dominio variable de inmunoglobulina contra una proteína sérica con semivida aumentada. Sin embargo, existe una clara necesidad de estrategias alternativas y/o mejoradas para prolongar la semivida de dominios variables individuales de inmunoglobulina.

55 La generación de dominios variables de inmunoglobulina, tales como Nanobodies, se ha descrito extensamente en diversas publicaciones, entre las cuales pueden ejemplificarse el documento WO 94/04678, Hamers-Casterman *et al.* (*Nature*. 3 de junio de 1993; 363(6428):446-8) y S. Muildermans (*J Biotechnol.* Junio de 2001; 74(4):277-302 Review). En estos métodos, se inmunizan camélidos tales como llamas con el antígeno diana con el fin de inducir una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno diana. El repertorio de Nanobodies obtenidos a partir de dicha inmunización se examina además para detectar Nanobodies que se unen al antígeno diana.

65 Actualmente, la técnica no proporciona ningún método para administrar de manera sistémica dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos (por ejemplo, tales como Nanobodies y/o constructos de los mismos) por medio de absorción de tejido pulmonar en una cantidad eficaz. El documento WO2007049017 describe un dominio variable individual de inmunoglobulina que se administró a los pulmones pero no se administró de manera sistémica en cantidades sustanciales.

Un objetivo de la presente invención es superar estos inconvenientes de la técnica. En particular un objetivo de la presente invención es proporcionar un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso en un método para administrar dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos del mismo a un mamífero, por ejemplo un ser humano. Además, los métodos descritos en el presente documento proporcionan una administración sostenida de dichos dominios variables individuales de inmunoglobulina.

Los problemas mencionados en el presente documento se superan mediante la presente invención. Se ha encontrado que la administración de dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos pueden dar como resultado una liberación sostenida de dichos dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos en la circulación sistémica en una cantidad eficaz, es decir una cantidad que puede tener un efecto profiláctico y/o terapéutico.

La presente invención se refiere a lo siguiente. Un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo dirigido contra al menos un antígeno para su uso en un método de tratamiento mediante la administración de una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica de un humano por medio de la vía pulmonar; en el que el método comprende la etapa de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar a intervalos de dosificación de una vez al día o más.

La presente invención se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso tal como se define en las reivindicaciones, en el que el procedimiento de administración comprende la etapa de formar un aerosol que comprende dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo mediante un dispositivo de inhalador apropiado.

La presente invención se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso tal como se define en las reivindicaciones, en el que la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad:

a) en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en no más de 150 residuos de aminoácido, la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 10 % tras la administración de una administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo;

b) en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en no más de 300 residuos de aminoácido, la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 7,5 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo; o

c) en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en no más de 450 residuos de aminoácido, la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 5 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo.

La presente invención se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso tal como se define en las reivindicaciones, en el que la semivida terminal de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en la circulación sistémica es mayor de 5 horas.

La presente invención se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso tal como se define en las reivindicaciones, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es un V_{HH} , un V_{HH} humanizado y/o constructo del mismo.

La presente invención se refiere a un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso tal como se define en las reivindicaciones, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo de un V_{HH} , un V_{HH} humanizado, un constructo que consiste en dos V_{HH} o V_{HH} humanizados dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador; y un constructo que consiste en 3 V_{HH} o V_{HH} humanizados dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.

También se divulga un método para proporcionar a la circulación sistémica de un mamífero una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo que puede unirse a y/o tener afinidad por al menos un antígeno; en el que el método comprende la etapa de:

a) administrar el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar de dicho mamífero.

5 En un método preferido, la administración en dicho método mencionado anteriormente se realiza inhalando dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en una nube de aerosol.

10 Según la invención, el dominio variable individual de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio, o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de un solo dominio, un "dAb", o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb, o un Nanobody, incluyendo pero sin limitarse a una secuencia de V_{HH} , y preferiblemente es un Nanobody.

15 Según la invención, el constructo que comprende al menos un dominio variable individual de inmunoglobulina puede ser un constructo o polipéptido diseñado a partir de las secuencias mencionadas anteriormente.

20 En una realización preferida el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo usado en el método mencionado anteriormente es un Nanobody y/o un constructo del mismo. En un aspecto preferido similar adicional, es decir cuando se usa un Nanobody y/o un constructo del mismo, el método incluye la administración pulmonar local eficaz de dicho Nanobody y/o un constructo del mismo.

25 Según la descripción, la inhalación de la nube de aerosol puede realizarse mediante un dispositivo de inhalador. El dispositivo debe generar a partir de una formulación que comprende el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo una nube de aerosol del tamaño de partícula deseado (distribución) en el momento apropiado del ciclo de inhalación del mamífero, que contiene la dosis correcta del dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo ("Pulmonary Drug Delivery", editado por Karoline Bechtold-Peters, Henrik Luessen, 2007, ISBN 978-3-87193-322-6, página 125).

30 La aplicación también describe usos, formulaciones y dispositivos adecuados en la realización de los métodos de la descripción.

Descripción detallada

35 La presente invención abarca, pero no se limita a, la materia de las reivindicaciones adjuntas y aspectos preferidos tal como se describe en el presente documento.

A) Definiciones

40 A menos que se indique o se defina otra cosa, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que quedará claro para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.^a ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing y Wiley Interscience, 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", 2.^a edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6.^a ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt *et al.*, Roitt's Essential Immunology, 10.^a ed. Blackwell Publishing, RU (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6.^a ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica anterior general mencionada en el presente documento.

50 A menos que se indique otra cosa, el término "dominio variable individual de inmunoglobulina", ya se use en el presente documento para referirse a, por ejemplo, un Nanobody o a un dAb, se usa como un término general para incluir tanto el Nanobody o dAb de tamaño completo, así como fragmentos funcionales de los mismos. Los términos moléculas de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno se usan de manera intercambiable con dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructos del mismo, e incluyen Nanobodies y sus constructos. Según la invención, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser anticuerpos de dominio, o secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, o secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como anticuerpos de un solo dominio, "dAb", o secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies, incluyendo pero sin limitarse a secuencias de V_{HH} humanizadas, secuencias de V_{HH} maduradas por afinidad, secuencias de V_{HH} y/o químicamente estabilizadas con solubilización mejorada y preferiblemente son Nanobodies. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina proporcionados por la invención están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de un constructo, proteína o polipéptido de la invención (tal como se define en el presente documento), que pueden comprender o consistir esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos de la invención. Por ejemplo, y sin limitación, la una o más secuencias de aminoácidos de la invención pueden usarse como una unidad de unión en un constructo, proteína o polipéptido de este tipo, para proporcionar un constructo monovalente, multivalente o multiespecífico de la invención, respectivamente, todo tal como se describe en el presente documento. Un constructo de este tipo puede estar

también en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento).

La invención incluye dominios variables individuales de inmunoglobulina de diferente origen, que comprende secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, asno, humano y camélido. La invención también incluye secuencias de inmunoglobulina completamente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, la invención comprende secuencias de inmunoglobulina de camélidos y secuencias de inmunoglobulina de camélidos humanizadas, o anticuerpos de dominio camelizados, por ejemplo dAb camelizado tal como se describe mediante el documento WO 94/04678). Además, la invención comprende secuencias de inmunoglobulina fusionadas, por ejemplo que forman un constructo multivalente y/ o multiespecífico (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios de V_{HH} y su preparación, se hace referencia también a Conrath *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 276, 10. 7346-7350, 2001, así como a, por ejemplo, los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221), y dominios variables individuales de inmunoglobulina que comprenden etiquetas u otros restos funcionales, por ejemplo toxinas, marcadores, productos radioquímicos, etc., que pueden derivarse de los dominios variables individuales de inmunoglobulina de la presente invención.

La secuencia de aminoácidos y estructura de dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular un Nanobody pueden considerarse, sin embargo, sin limitarse a lo mismo, que están compuestas por cuatro regiones de entramado o "FR", que se denominan en la técnica y en el presente documento "región de entramado 1" o "FR1"; "región de entramado 2" o "FR2"; "región de entramado 3" o "FR3"; y "región de entramado 4" o "FR4", respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente.

El número total de residuos de aminoácido en un Nanobody puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente de 112-115 y es lo más preferiblemente de 113. Sin embargo, debe indicarse que partes, fragmentos, análogos o derivados (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) de un Nanobody no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales explicados resumidamente en el presente documento y sean también preferiblemente adecuados para los fines descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término una secuencia para el "dominio variable individual de inmunoglobulina" puede referirse a ambas secuencias de ácido nucleico que codifican dicha molécula de inmunoglobulina, y al polipéptido de inmunoglobulina *per se*. Cualquier significado más limitativo resultará evidente a partir del contexto particular.

Todas estas moléculas también se denominan "agente(s) de la invención", que es sinónimo de "dominio(s) variable(s) individual(es) de inmunoglobulina y/o constructo(s) del/de los mismo(s)" de la invención.

Además, el término "secuencia" tal como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de dominio variable individual de inmunoglobulina", "secuencia de Nanobody", "secuencia de V_{HH} " o "secuencia de polipéptido"), debe entenderse generalmente que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante así como secuencias de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

A menos que se indique otra cosa, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se*, tal como quedará claro para el experto. Se hace de nuevo referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales y la técnica anterior general mencionada en el presente documento y a las referencias adicionales mencionadas en el mismo; así como a, por ejemplo, la siguiente revisión "Pulmonary Drug Delivery" (Bechtold-Peters y Luessen, eds., al que se hizo referencia anteriormente), que describe técnicas para la administración pulmonar de fármacos de productos biofarmacéuticos tales como el/los agente(s) de la invención.

En un aspecto específico y preferido, los dominios variables individuales de inmunoglobulina son Nanobodies contra, y en particular Nanobodies contra un antígeno quimiomodulable de un mamífero, y especialmente Nanobodies contra antígeno quimiomodulable humano; así como constructo(s) que comprenden al menos un Nanobody de este tipo. En particular, la invención proporciona Nanobodies contra un antígeno quimiomodulable, y constructos que comprenden el mismo, que tienen propiedades terapéuticas y/o farmacológicas mejoradas y/u otras propiedades ventajosas (tales como, por ejemplo, facilidad de preparación mejoradas y/o costes de bienes reducidos), en comparación con anticuerpos convencionales contra un antígeno quimiomodulable o fragmentos del mismo, en comparación con constructos que podrían basarse en tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpo convencionales (tales como fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, constructos de ScFv, "diacuerpos" y otros constructos multiespecíficos (véase, por ejemplo, la revisión de Holliger y Hudson, Nat Biotechnol. Septiembre de 2005; 23(9):1126-36)), y también en comparación con los denominados "dAb" o anticuerpos de (un solo) dominio similares que pueden derivarse de dominios variables de anticuerpos convencionales. Estas propiedades mejoradas y ventajosas quedarán claras a partir de la descripción adicional en el presente documento, y, por ejemplo, incluyen,

sin limitación, uno o más de:

- 5 - afinidad y/o avidéz aumentada por un antígeno quimiomodulable, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos a continuación en el presente documento);
- mejor idoneidad para formatear en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente);
- 10 - mejor idoneidad para formatear en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos a continuación en el presente documento);
- idoneidad o susceptibilidad mejorada para “humanizar” sustituciones;
- 15 - menos inmunogenicidad, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos a continuación en el presente documento);
- estabilidad aumentada, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos a continuación en el presente documento);
- 20 - especificidad aumentada hacia un antígeno quimiomodulable, o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos a continuación en el presente documento);
- 25 - reactividad cruzada disminuida o cuando se desee aumentada con un antígeno quimiomodulable de una especie diferente; y/o
- 30 - una o más de otras propiedades mejoradas deseables para uso farmacéutico (incluyendo uso profiláctico y/o uso terapéutico) y/o para uso de diagnóstico (incluyendo pero sin limitarse a uso para fines de obtención de imágenes), o bien en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o bien en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos a continuación en el presente documento).
- 35 Tal como se describe generalmente en el presente documento para el agente de la invención, los Nanobodies y constructo del mismo de la invención están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), en el que los constructos pueden comprender o consistir esencialmente en uno o más Nanobodies de la invención. Por ejemplo, y sin limitación, el Nanobody de la invención puede usarse como unidad de unión en un constructo de este tipo, que puede contener opcionalmente uno o más Nanobodies adicionales que
- 40 pueden servir como unidad de unión (es decir contra uno o más de otros antígenos quimiomodulables), para proporcionar un constructo monovalente, multivalente o multiespecífico de la invención, respectivamente, todo tal como se describe en el presente documento. En particular, un constructo de este tipo puede comprender o consistir esencialmente en uno o más Nanobodies de la invención y opcionalmente uno o más (de otros) Nanobodies (es
- 45 decir dirigidos contra otros antígenos quimiomodulables), todos opcionalmente unidos por medio de uno o más ligadores adecuados, para proporcionar constructos de Nanobodies monovalentes, multivalentes o multiespecíficos, respectivamente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Tales proteínas o polipéptidos pueden estar también en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento).
- 50 En un Nanobody de la invención, el sitio de unión para la unión contra un antígeno quimiomodulable está formado preferiblemente por las secuencias de CDR. Opcionalmente, un Nanobody de la invención puede contener también, y además del al menos un sitio de unión para la unión contra un antígeno quimiomodulable, uno o más sitios de unión adicionales para la unión contra otros antígenos. Para métodos y posiciones para introducir tales segundos
- 55 sitios de unión, se hace referencia, por ejemplo, a Keck y Huston, Biophysical Journal, 71, octubre de 1996, 2002-2011; documento EP 0 640 130; y documento WO 06/07260.
- 60 Tal como se describe generalmente en el presente documento para las secuencias de aminoácidos de la invención, cuando un Nanobody de la invención (o un polipéptido de la descripción que comprende el mismo) está previsto para su administración a un sujeto (por ejemplo, para propósitos terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico tal como se describe en el presente documento), está dirigido preferiblemente contra un antígeno quimiomodulable humano; mientras que para propósitos veterinarios, está dirigido preferiblemente contra un antígeno quimiomodulable de la especie que va a tratarse. Además, como con las secuencias de aminoácidos de la descripción, un Nanobody de la invención puede o no reaccionar de manera cruzada (es decir dirigido contra un
- 65 antígeno quimiomodulable de dos o más especies de mamífero, tal como contra un antígeno quimiomodulable humano y un antígeno quimiomodulable de al menos una de las especies de mamífero mencionadas en el presente documento).

Además, de nuevo tal como se describe generalmente en el presente documento para los agentes de la invención, los Nanobodies de la invención pueden estar dirigidos generalmente contra cualquier determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o conformación de un antígeno quimiomodulable.

5 Tal como ya se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos y estructura de un Nanobody puede considerarse, sin embargo, sin limitarse a lo mismo, que están compuestas por cuatro regiones de entramado o "FR" (o algunas veces denominadas "FW"), que se denominan en la técnica y en el presente documento "región de entramado 1" o "FR1"; "región de entramado 2" o "FR2"; "región de entramado 3" o "FR3"; y "región de entramado 4" o "FR4", respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Algunas secuencias de entramado y CDR preferidas (y combinaciones de las mismas) que están presentes en los Nanobodies de la invención son tal como se describe, por ejemplo, en la página 146ff del documento WO2008/074839.

15 Según un aspecto preferido pero no limitativo de la invención, (las secuencias de CDR presentes en) los Nanobodies de la invención son tales que:

20 - los Nanobodies pueden unirse a un antígeno quimiomodulable con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más y más preferiblemente de 10^9 a 10^{12} litros/moles);

25 y/o tales que:

- los Nanobodies pueden unirse a un antígeno quimiomodulable con una velocidad k_{on} de entre $10^2 M^{-1}s^{-1}$ a aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, tal como entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$;

30 y/o tales que:

- los Nanobodies pueden unirse a un antígeno quimiomodulable con una velocidad k_{off} de entre $1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,69 s$) y $10^{-6} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con una $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente de entre $10^{-2} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, tal como entre $10^{-4} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$.

35 Preferiblemente, (las secuencias de CDR presentes en) los Nanobodies de la invención son tales que: un Nanobody monovalente de la invención (o un polipéptido que contiene solo un Nanobody de la invención) es preferiblemente tal que se unirá a un antígeno quimiomodulable con una afinidad de menos de 500 nM, preferiblemente menos de 200 nM, más preferiblemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 pM.

40 La afinidad del Nanobody de la invención contra un antígeno quimiomodulable puede determinarse de una manera conocida *per se*, por ejemplo usando las técnicas generales para medir K_D , K_A , k_{off} o k_{on} mencionadas en el presente documento, así como algunos de los ensayos específicos descritos en el presente documento.

45 Algunos valores de CI_{50} preferidos para la unión de los Nanobodies de la invención (y de polipéptidos que comprenden los mismos) a un antígeno quimiomodulable quedarán claros a partir de la descripción adicional y los ejemplos en el presente documento.

50 La invención se refiere a dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos que pueden unirse a y/o tener afinidad por un antígeno tal como se define en el presente documento. En el contexto de la presente invención, "que se une a y/o que tiene afinidad por" un determinado antígeno tiene el significado habitual en la técnica tal como se entiende, por ejemplo, en el contexto de anticuerpos y sus respectivos antígenos.

55 En realizaciones particulares de la invención, el término "se une a y/o que tiene afinidad por" significa que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo interacciona específicamente con un antígeno, y se usa de manera intercambiable con dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos "contra" dicho antígeno.

60 El término "especificidad" se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinante antigénicos a los que pueden unirse dominios variables individuales particulares de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos (tales como un Nanobody u otro agente de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en la afinidad y/o avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (K_D), es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor es el valor de la K_D , mayor es la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión a antígeno (alternativamente, la afinidad puede expresarse también como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$). Tal como

quedará claro para el experto (por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en el presente documento), la afinidad puede determinarse de una manera conocida *per se*, dependiendo del antígeno de interés específico. La avides es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un Nanobody u otro agente de la invención) y el antígeno pertinente. La avides se refiere a tanto la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno como al número de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión a antígeno.

Normalmente, los dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos de la presente invención (tal como los Nanobodies y/u otros agentes de la invención) se unirán a su antígeno con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litros/moles); y/o se unirán a antígenos tal como se define, por ejemplo, en el presente documento con una velocidad k_{on} de entre $10^2 M^{-1}s^{-1}$ a aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$, tal como entre $10^5 M^{-1}s^{-1}$ y $10^7 M^{-1}s^{-1}$; y/o se unirán a los antígenos tal como se define, por ejemplo, en el presente documento con una velocidad k_{off} de entre $1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,69 s$) y $10^{-6} s^{-1}$ (proporcionando un complejo casi irreversible con una $t_{1/2}$ de múltiples días), preferiblemente entre $10^{-2} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, tal como entre $10^{-4} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$.

Cualquier valor de K_D mayor de 10^{-4} moles/litro (o cualquier valor de K_A menor de $10^4 M^{-1}$) litros/mol se considera generalmente que indica unión inespecífica.

Preferiblemente, un dominio variable individual de inmunoglobulina monovalente de la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM.

La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas *per se* en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente documento.

La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente, tal como quedará claro para el experto. Métodos para determinar la constante de disociación quedarán claros para el experto, y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas en el presente documento. En este sentido, también quedará claro que puede no ser posible medir constantes de disociación de más de 10^{-4} moles/litro o 10^{-3} moles/litro (por ejemplo, de 10^{-2} moles/litro). Opcionalmente, tal como quedará claro para el experto, la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse basándose en la constante de asociación (K_A) (real o aparente), por medio de la relación [$K_D = 1/K_A$].

La afinidad indica la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad viene dada comúnmente como la K_D , o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como una constante de asociación, K_A , que es igual a $1/K_D$ y tiene unidades de $(\text{mol/litro})^{-1}$ (o M^{-1}). En la presente memoria descriptiva, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas (tal como un agente de la invención y su antígeno previsto) se expresará principalmente en cuanto al valor de K_D de su interacción; quedará claro para el experto que en vista de la relación $K_A = 1/K_D$, la especificación de la fuerza de interacción molecular mediante su valor de K_D también puede usarse para calcular el valor de K_A correspondiente. El valor de K_D caracteriza la fuerza de una interacción molecular también en un sentido termodinámico ya que se refiere a la energía libre (ΔG) de unión mediante la relación bien conocida $\Delta G = RT \cdot \ln(K_D)$ (de manera equivalente $\Delta G = -RT \cdot \ln(K_A)$), donde R es igual a la constante de gases, T es igual a la temperatura absoluta y ln indica el logaritmo natural.

La K_D para interacciones biológicas, tales como la unión de los agentes de la invención a los antígenos tal como se define, por ejemplo, en el presente documento, que se consideran significativos (por ejemplo, específicos) están normalmente en el intervalo de $10^{-10} M$ (0,1 nM) a $10^{-5} M$ (10 000 nM). Cuanto más fuerte es una interacción, menor es su K_D .

La K_D puede expresarse también como la razón de la constante de velocidad de disociación de un complejo, indicada como k_{off} , con respecto a la velocidad de su asociación, indicada k_{on} (de modo que $K_D = k_{off}/k_{on}$ y $K_A = k_{on}/k_{off}$). La velocidad de disociación k_{off} tiene como unidad s^{-1} (donde s es la notación de unidad del SI de segundo). La velocidad de asociación k_{on} tiene unidades de $M^{-1}s^{-1}$.

Con respecto a los agentes de la invención, la velocidad de asociación puede variar entre $10^2 M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, aproximándose a la constante de velocidad de asociación limitada por difusión para interacciones bimoleculares. La velocidad de disociación se refiere a la semivida de una interacción molecular dada mediante la relación $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$. La velocidad de disociación de secuencias de inmunoglobulina de la invención puede variar entre $10^{-6} s^{-1}$ (complejo casi irreversible con una $t_{1/2}$ de múltiples días) y $1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,69 s$).

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse por medio de diferentes técnicas conocidas *per se*, tales como la técnica de biodetector de resonancia de plasmón superficial (SPR) bien conocida (véase, por ejemplo, Ober *et al.*, Intern. Immunology, 13, 1551-1559, 2001) en donde una molécula se inmoviliza sobre el chip del biodetector y la otra molécula se hace pasar sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo que producen mediciones de k_{on} , k_{off} y por tanto valores de K_D (o K_A). Esto puede realizarse, por ejemplo, usando los instrumentos Biacore bien conocidos.

También quedará claro para el experto que la K_D medida puede corresponder a la K_D aparente si el proceso de medición influye algo en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo por artefactos relacionados con el recubrimiento sobre el biodetector de una molécula. Además, puede medirse una K_D aparente si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la otra molécula. En tal situación, la afinidad medida puede verse afectada por la avidéz de la interacción mediante las dos moléculas.

Otro enfoque que puede usarse para evaluar la afinidad es el procedimiento de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) de 2 etapas de Friguet *et al.* (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985). Este método establece una medición en equilibrio de unión en fase de disolución y evita posibles artefactos relacionados con la adsorción de una de las moléculas sobre un soporte tal como plástico.

Sin embargo, la medición precisa de K_D puede ser bastante laboriosa y, como consecuencia, a menudo se determinan los valores de K_D aparente para evaluar la fuerza de unión de dos moléculas. Debe indicarse que, siempre que todas las mediciones se realicen de un modo sistemático (por ejemplo, manteniendo las condiciones de ensayo sin cambios), pueden usarse las mediciones de K_D aparente como una aproximación del valor de K_D verdadero y por tanto en el presente documento K_D y K_D aparente deben tratarse con igual importancia o relevancia.

Finalmente, debe indicarse que en muchas situaciones el científico experimentado puede considerar si es conveniente determinar la afinidad de unión en relación con alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la fuerza de unión entre las moléculas A y B, puede usarse, por ejemplo, una molécula de referencia C que se sabe que se une a B y que está marcada adecuadamente con un grupo fluoróforo o cromóforo u otro resto químico, tal como biotina para su fácil detección en un ELISA o FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) u otro formato (el fluoróforo para la detección de fluorescencia, el cromóforo para la detección de la absorción de luz, la biotina para detección por ELISA mediada por estreptavidina). Normalmente, la molécula de referencia C se mantiene a una concentración fija y la concentración de A se varía para una concentración o cantidad dada de B. Como resultado se obtiene un valor de CI_{50} correspondiente a la concentración de A a la que la señal medida para C en ausencia de A es la mitad. Siempre que la $K_{D\ ref}$, la K_D de la molécula de referencia, se conozca, así como la concentración total C_{ref} de la molécula de referencia, puede obtenerse la K_D aparente para la interacción A-B a partir de la siguiente fórmula: $K_D = CI_{50}/(1+C_{ref}/K_{D\ ref})$. Obsérvese que si $C_{ref} \ll K_{D\ ref}$, $K_D \approx CI_{50}$. Siempre que la medición de la CI_{50} se realice de un modo sistemático (por ejemplo, manteniendo C_{ref} fija) para los aglutinantes que se comparan, puede evaluarse la fuerza o estabilidad de una interacción molecular mediante la CI_{50} y esta medición se considera equivalente a K_D o a K_D aparente a lo largo de todo este texto.

En el contexto de la presente invención, "circulación sistémica" indica la porción del sistema cardiovascular que transporta sangre oxigenada lejos del corazón, hasta el cuerpo, y devuelve sangre desoxigenada de nuevo al corazón (véase, por ejemplo, la Wikipedia).

En el contexto de la presente invención, "tejido pulmonar" es para los propósitos de esta invención equivalente a tejido del pulmón o pulmón. El pulmón comprende 2 zonas distintas: una zona conductora y una respiratoria, dentro de la cual se encuentran las vías respiratorias y los compartimentos vasculares (véase, por ejemplo, "Pulmonary Drug Delivery, Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente, páginas 16-28).

En el contexto de la presente invención, "aerosol" indica una suspensión de partículas sólidas finas o gotitas líquidas (o combinación de las mismas) en un gas en el que para los propósitos de esta invención las partículas y/o gotitas comprenden el/los agente(s) de la invención.

En el contexto de la presente invención, la "semivida" de un agente de la invención puede definirse generalmente tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 y tal como se menciona en el mismo se refiere al tiempo que tarda la concentración sérica de la secuencia de aminoácidos, compuesto o polipéptido en reducirse un 50 %, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación de la secuencia o el compuesto y/o el aclaramiento o secuestro de la secuencia o compuesto por mecanismos naturales. La semivida *in vivo* de un agente de la invención puede determinarse de cualquier manera conocida *per se*, tal como mediante análisis farmacocinético. Quedarán claras técnicas adecuadas para el experto en la técnica, y pueden ser, por ejemplo, generalmente tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079. También tal como se menciona en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079, la semivida puede expresarse usando parámetros tales como la $t_{1/2}$ -alfa, $t_{1/2}$ -beta y el área bajo la curva (AUC). Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, tales como Kennet, A *et al.*: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y Peters *et al.*, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Se hace referencia también a

“Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2.^a rev. edición (1982). Los términos “aumento en la semivida” o “semivida aumentada” son también tal como se define en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 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. Además, en el contexto de la presente invención el término “semivida plasmática terminal” es el tiempo requerido para dividir la concentración plasmática entre dos tras alcanzar un pseudoequilibrio, y no el tiempo requerido para eliminar la mitad de la dosis administrada. Cuando el proceso de adsorción no es un factor limitante, la semivida es un parámetro híbrido controlado por el aclaramiento del plasma y el grado de distribución. En cambio, cuando el proceso de absorción es un factor limitante, la semivida terminal refleja la velocidad y el grado de absorción y no el proceso de eliminación (farmacocinética flip-flop). La semivida terminal es especialmente relevante para regímenes de dosificación múltiple, porque controla el grado de acumulación de fármaco, fluctuaciones de la concentración y el tiempo que se tarda en alcanzar el equilibrio.

En el contexto de la presente invención, la “biodisponibilidad” de un aerosol inhalado que comprende el agente de la invención puede determinarse usando perfiles de concentración plasmática-tiempo comparando el área bajo la curva de concentración-tiempo tras la inhalación (denominada en el presente documento como “AUC-inh”) con la obtenida tras administración intravenosa (denominada en el presente documento “AUC-iv”) en el que un aerosol es una suspensión de partículas sólidas finas o gotitas líquidas en un gas. La “biodisponibilidad absoluta” (denominada en el presente documento “F-inh”) tras la inhalación puede calcularse entonces mediante la ecuación $F\text{-inh} = \text{AUC-inh} / \text{AUC-iv}$ (cuando las dosis inhalada e intravenosa son idénticas).

En el contexto de la presente invención, “tau” es un intervalo de tiempo e indica el intervalo de dosificación.

En el contexto de la presente invención, el/los “antígeno(s)” define(n) todos los antígenos que son quimiomodulables para el experto en la técnica e incluyen todos los sitios de interacción quimiomodulables de un antígeno. Antígeno(s) particularmente preferido(s) es/son el/los antígeno(s) tal como se describe(n), por ejemplo, en el presente documento tal(es) como factor de von Willebrand humano, ligando RANK humano y /o antígeno(s) viral(es) tal(es) como VSR y/o virus de la gripe aviar.

Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno” pretende incluir, y también se refiere a, cualquier parte, fragmento, subunidad, epítipo o dominio de dicho antígeno. Cualquier subsección de una célula en la que el antígeno está asociado se encuentra dentro del alcance de la presente invención, siempre que represente un antígeno quimiomodulable de interés. En particular, la presente invención se refiere a dominios variables individuales de inmunoglobulina dirigidos a antígenos en su conformación natural. En el contexto de la presente invención, “conformación natural” significa que el antígeno presenta su estructura secundaria y/o terciaria. En otras palabras, la conformación natural describe el antígeno en una forma no desnaturalizada, y describe una conformación en la que están presentes los epítipos conformacionales o lineales. Específicamente, el antígeno tendrá la conformación que está presente cuando el antígeno está integrado en un mamífero, por ejemplo firmemente unido a una membrana celular de dicho mamífero. Pueden obtenerse antígenos en su conformación natural cuando están presentes en células que comprenden células naturales o transfectadas que expresan el antígeno asociado a células, extractos de membrana derivados de células, vesículas o cualquier otro derivado de membrana que alberga un antígeno, liposomas o partículas de virus que expresan el antígeno asociado a células. En cualquiera de estas realizaciones, puede enriquecerse el antígeno por medios adecuados. Dicho antígeno asociado a células puede expresarse en cualquier célula adecuada que permita la expresión del antígeno en su conformación natural o nativa, abarcando, pero sin limitarse a Cho, Cos7, Hek293 o células de origen de camélido.

El experto apreciará que puede haber diferentes conformaciones tridimensionales específicas que están abarcadas por el término “conformación natural”. Si, por ejemplo, una proteína tiene dos o más conformaciones diferentes mientras está en un entorno de membrana, todas estas conformaciones se considerarán “conformaciones naturales”. Esto se ejemplifica por receptores que cambian su conformación mediante activación, por ejemplo los diferentes estados de activación de la rodopsina inducidos por la luz, o canales iónicos que muestran una conformación “cerrada” o “abierta”. La invención abarca secuencias de inmunoglobulina para una cualquiera de estas diferentes conformaciones naturales, es decir para las diferentes clases de epítipos conformacionales que pueden estar presentes.

El antígeno es preferiblemente un sitio de interacción quimiomodulable de un antígeno que tiene, cuando se modula, un efecto profiláctico y/o terapéutico en un mamífero, por ejemplo un humano, preferiblemente en un mamífero, por ejemplo humano, que corre el riesgo y/o tiene una enfermedad.

En el contexto de la presente invención, el término “sitio de interacción” en el antígeno significa un sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o antígeno que es un sitio para la unión a un ligando, receptor u otra pareja de unión, un sitio catalítico, un sitio de escisión, un sitio para interacción alostérica, un sitio implicado en multimerización (tal como homomerización o heterodimerización) del antígeno; o cualquier otro sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o antígeno que está implicado en una acción o mecanismo biológico del antígeno. Más generalmente, un “sitio de interacción” puede ser cualquier sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en el antígeno al que un agente de la invención puede unirse de manera que el antígeno (y/o

cualquier ruta, interacción, señalización, mecanismo biológico o efecto biológico en el que el antígeno está implicado) se modula.

5 En el contexto de la presente invención, “modulación” o “modular” significa generalmente o bien reducir o bien inhibir la actividad de, o alternativamente aumentar la actividad de, una diana o antígeno, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado. En particular, “modulación” o “modular” puede significar o bien reducir o bien inhibir la actividad de, o alternativamente aumentar una actividad biológica (relevante o prevista) de una diana o antígeno, tal como se mide usando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (lo que dependerá habitualmente de la diana o antígeno implicado), en al menos el 1 %, preferiblemente al menos el 5 %, tal como al menos el 10 % o al menos el 25 %, por ejemplo en al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o el 90 % o más, en comparación con la actividad de la diana o el antígeno en el mismo ensayo en las mismas condiciones pero sin la presencia del constructo de la invención.

15 Tal como quedará claro para el experto, la “modulación” también puede implicar efectuar un cambio (que puede ser o bien un aumento o bien una disminución) en la afinidad, avidéz, especificidad y/o selectividad de una diana o antígeno para uno o más de sus ligandos, parejas de unión, parejas para su asociación en una forma homomultimérica o heteromultimérica, o sustratos; y/o efectuar un cambio (que puede ser o bien un aumento o bien una disminución) en la sensibilidad de la diana o antígeno para una o más condiciones en el medio o alrededores en el que la diana o antígeno está presente (tal como pH, fuerza iónica, la presencia de cofactores, etc.), en comparación con las mismas condiciones pero sin la presencia del constructo de la invención. Tal como quedará claro para el experto, esto puede determinarse de nuevo de cualquier manera adecuada y/o usando cualquier ensayo adecuado conocido *per se*, dependiendo de la diana o antígeno implicado.

25 La “modulación” también puede significar efectuar un cambio (es decir una actividad como agonista, como antagonista o como agonista inverso, respectivamente, dependiendo de la diana o antígeno y el efecto biológico o fisiológico deseado) con respecto a uno o más mecanismos, efectos, respuestas, funciones, rutas o actividades biológicas o fisiológicas en las que la diana o antígeno (o en las que su(s) sustrato(s), ligando(s) o rutas(s) está(n) implicada(s)), tal como su ruta de señalización o ruta metabólica y sus efectos biológicos o fisiológicos asociados) se modula. De nuevo, tal como quedará claro para el experto, una acción de este tipo como agonista o antagonista puede determinarse de cualquier manera adecuada y/o usando cualquier ensayo adecuado (*in vitro* y habitualmente celular o en ensayo) conocido *per se*, dependiendo de la diana o antígeno implicado. En particular, una acción como agonista o antagonista puede ser tal que una actividad biológica o fisiológica prevista se aumenta o se disminuye, respectivamente, en al menos el 1 %, preferiblemente al menos el 5 %, tal como al menos el 10 % o al menos el 25 %, por ejemplo en al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o el 90 % o más, en comparación con la actividad biológica o fisiológica en el mismo ensayo en las mismas condiciones pero sin la presencia del constructo de la invención.

40 La modulación puede implicar también, por ejemplo, modulación alostérica de la diana o antígeno; y/o reducción o inhibición de la unión de la diana o antígeno a uno de sus sustratos o ligandos y/o competición con un ligando natural, sustrato para la unión a la diana o antígeno. La modulación también puede implicar activar la diana o antígeno o el mecanismo o la ruta en el que está implicado. La modulación puede implicar también, por ejemplo, efectuar un cambio con respecto al plegamiento o la conformación de la diana o antígeno, o con respecto a la capacidad de la diana o antígeno para plegarse, cambiar su conformación (por ejemplo, tras la unión de un ligando), asociarse con otras (sub)unidades o disociarse. La modulación puede implicar también, por ejemplo, efectuar un cambio en la capacidad de la diana o antígeno para transportar otros compuestos o para servir como canal para otros compuestos (tales como iones). La modulación puede ser reversible o irreversible, pero para fines farmacéuticos y farmacológicos será habitualmente reversible.

50 En el contexto de la presente invención, “animal no humano” incluye, pero no se limita a un vertebrado, tiburón, mamífero, lagartija, camélido, llama, preferiblemente camélidos y lo más preferiblemente llama o alpaca.

B) Los métodos de la presente descripción

55 La presente invención se refiere a dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos para su uso en un método para proporcionar a la circulación sistémica de un mamífero una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo que puede unirse a y/o tener una afinidad por al menos un antígeno, tal como se define en el presente documento. El método comprende la siguiente etapa: a) administrar el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar de dicho mamífero.

60 Por tanto, en términos generales (y de un modo preferido) el método de la presente descripción incluye la administración sistémica de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a un mamífero principalmente por medio de absorción en el tejido pulmonar. En una realización particular, el mamífero es un humano. En otra realización particular, la administración se logra inhalando dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en el tejido pulmonar en una nube de aerosol.

65

Una ventaja particular de la presente invención radica en el hecho de que la administración de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo puede aplicarse ampliamente y da como resultado una exposición sistémica prolongada de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo. El método de la descripción no se limita a tener, por ejemplo, propiedades de unión a proteínas séricas, por ejemplo unión a albúmina sérica, de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para lograr una exposición prolongada sino que puede incluir también tales constructos. En particular, no hay ningún requisito para extender el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo dirigido contra el antígeno para añadir una unidad de unión adicional dirigida contra un antígeno particular, por ejemplo aglutinante de albúmina sérica, con el fin de prolongar el tiempo de exposición en la circulación sistémica. Ventajosamente, para algunos de tales constructos (por ejemplo, el Nanobody y los constructos en la parte experimental del ejemplo 1), el método también implica que pueda realizarse un cálculo de la dosis relativamente sencillo para dosificación múltiple basándose en la semivida terminal experimental, tau y biodisponibilidad (basándose en la suposición de que la etapa limitante de la velocidad de las propiedades farmacocinéticas del dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo está controlada por la absorción). Por tanto, el método de la presente descripción puede aplicarse ampliamente a cualquier antígeno quimiomodulable, en particular un sitio de interacción. En particular, por ejemplo en una realización preferida, el presente método puede aplicarse a antígenos para los que está disponible un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo potente (por ejemplo, una CI_{50} subnanomolar en un ensayo *in vitro* relevante), en particular Nanobody y/o constructo del mismo, frente a dicho antígeno.

En un aspecto adicional, el método de administración sistémica por medio de la vía pulmonar puede ser beneficioso para constructos de dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen a y/o tienen una afinidad específica por un antígeno que tiene un efecto profiláctico y/o terapéutico cuando se modula y se une a y/o tiene una afinidad específica por proteína sérica tal como, por ejemplo, albúmina sérica, por ejemplo albúmina sérica humana. Para un constructo de este tipo el pulmón puede no ser ya la etapa limitante de la velocidad, y por tanto la semivida en este caso puede estar dirigida por el aclaramiento y la distribución.

Por tanto, la presente invención es ventajosa en comparación con dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos de la técnica anterior para su uso en métodos que no mencionan las propiedades divulgadas en el presente documento. En particular no hay ninguna enseñanza en la técnica de que un método de este tipo para la administración de dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos a la circulación sistémica de mamíferos tales como humano sea capaz de extender la semivida y biodisponibilidad.

Más específicamente, la presente invención proporciona un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso en un método de primera clase para administrar una cantidad eficaz de dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos a la circulación sistémica de mamíferos por medio de la vía pulmonar, que, según una realización específica, se proporciona inhalando una formulación de dosificación farmacéutica con un dispositivo de inhalador.

El dispositivo debe generar a partir de la formulación una nube de aerosol del tamaño de partícula deseado de las partículas sólidas finas o gotitas líquidas (distribución) en el momento apropiado del ciclo de inhalación del mamífero, que contiene la dosis correcta de los dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o constructos de los mismos. Los siguientes 4 requisitos (formulación, tamaño de partícula, tiempo y dosis) deben considerarse (Pulmonary Drug Delivery, Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente, páginas 125 y 126):

- Las formulaciones que se usan en los dispositivos pueden variar desde disoluciones o suspensiones acuosas usadas en nebulizadores hasta las disoluciones o suspensiones basadas en propelente usadas en inhalador de dosis medida o incluso mezclas de polvo diseñadas especialmente para los inhaladores de polvo seco. Todas estas formulaciones diferentes requieren diferentes principios para la generación del aerosol, lo que resalta la dependencia mutua del dispositivo y la formulación (por ejemplo, la formulación de nebulizador puede contener agua con codisolventes tales como PEG, etanol o glicina (en "Inhalation Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins" (1997), 2 párr., página 246);

- puesto que el sitio de deposición de las partículas de aerosol depende de su tamaño (aerodinámico) y velocidad, el tamaño de partícula deseado de la nube de aerosol varía dependiendo del sitio de deposición deseado en el pulmón, que está relacionado con el objetivo terapéutico de la administración. Preferiblemente los agentes de la invención que van a absorberse en la circulación sistémica deben depositarse en los alveolos. Por tanto, preferiblemente el tamaño de partícula para los agentes de la invención para un humano puede estar dentro del intervalo de 1 a 5 micrómetros (véase también, por ejemplo, en particular la página 245 en "Inhalation Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins" (1997): la mediana de los diámetros de masa oscila normalmente entre 2 y 5 μm en nebulizadores);

- puesto que la nube de aerosol puede ajustarse para que se libere en diferentes momentos durante el ciclo de inhalación generado por el mamífero, se prefiere que para los agentes de la invención (que van a depositarse en las partes periféricas del pulmón) el aerosol se libere al inicio del ciclo de inhalación;

- la variedad de los agentes de la invención que se propone que van a administrarse por medio de la vía pulmonar implica que las dosis pueden variar considerablemente y, por ejemplo, pueden variar, por ejemplo, para un humano desde unos pocos microgramos hasta varios cientos de microgramos o incluso miligramos, por ejemplo

Se describen, por ejemplo, diversos sistemas de inhalación en las páginas 129 a 148 en la revisión (“Pulmonary Drug Delivery”, Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente) e incluyen, pero no se limitan a, nebulizadores tales como, por ejemplo, nebulizadores de malla vibratoria, inhaladores de dosis medida, inhaladores líquidos de dosis medida e inhaladores de polvo seco. También pueden usarse dispositivos que tienen en cuenta un patrón de respiración optimizado e individualizado para maniobras de inhalación controladas (véase, por ejemplo, la tecnología AKITA® en la página 157 de “Pulmonary Drug Delivery”, Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente). Tradicionalmente, los nebulizadores se han clasificado en dos tipos principales: dispositivos de chorro de aire (neumáticos). Recientemente, se ha comercializado un tercer tipo, nebulizadores de malla vibratoria (Newman, S., Gee-Turner, A., 2005. The Omron MicroAir Vibrating mesh technology nebuliser, a 21st century approach to inhalation therapy. *J. Appl. Ther. Res.* 5, 29-33). Los nebulizadores de chorro de aire convierten un líquido en aerosoles por medio de un gas a alta velocidad que pasa a través de una ventana “venturi” estrecha. El fluido en el depósito del nebulizador se extrae con un tubo de alimentación y emerge como filamentos finos que colapsan dando gotitas de aerosol debido a la tensión superficial. En nebulizadores ultrasónicos, se emplea un cristal piezoeléctrico que vibra a alta frecuencia para generar el aerosol. Se produce una fuente de fluido en la superficie de contacto aire-fluido. Se generan gotitas pequeñas a partir de las regiones inferiores de la fuente al tiempo que se generan gotitas grandes a partir del vértice. En nebulizadores tanto de chorro de aire como ultrasónico, deflectores en el nebulizador atrapan y recirculan las gotitas de aerosol grandes (primarias), mientras que las gotitas pequeñas (secundarias) se liberan para la inhalación. En nebulizadores de chorro de aire, la salida del aerosol comprende gotitas aerosolizadas y vapor de disolvente que satura el aire saliente. Esto induce el enfriamiento del fluido del nebulizador y aumenta la concentración de soluto en el volumen residual (Cockcroft, D.W., Hurst, T.S., Gore, B.P., 1989. Importance of evaporative water losses during standardized nebulized inhalation provocation tests. *Chest* 96, 505-508). Los nebulizadores ultrasónicos no son generalmente adecuados para la administración de suspensiones (Tailor, K.M.G., McCallion, O.N.M., 2002. Ultrasonic nebulizers. En: Swarbrick, J., Boilan, J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2.ª ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, págs. 2840-2847) y liposomas (Elhissi, A.M.A., Tailor, K.M.G., 2005. Delivery of liposomes generated from proliposomes using air-jet, ultrasonic, and vibrating-mesh nebulisers. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 15, 261-265), y debido a la generación de calor durante la atomización pueden degradar sustancias lábiles tales como proteínas (Niven, R.W., Ip, A.Y., Mittelman, S., Prestrelski, S.J., Arakawa, T., 1995. Some factors associated with the ultrasonic nebulization of proteins. *Pharm. Res.* 12, 53-59).

Los nebulizadores de malla vibratoria pueden superar las desventajas de nebulizadores de chorro de aire y ultrasónicos. Los dispositivos de malla vibratoria emplean placas perforadas que vibran con el fin de generar el aerosol. Estos nebulizadores no calientan el fluido durante la atomización y se ha mostrado que son adecuados para la administración de suspensiones (Fink, J.B., Simmons, B.S., 2004. Nebulization of steroid suspension: an *in vitro* evaluation of the Aeroneb Go y Pari LC Plus nebulizers. *Chest* 126, 816S), y estructuras delicadas tales como liposomas (Wagner, A., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H., 2006. Nebulization of liposomal rh-Cu/Zn-SOD with a novel vibrating membrane nebulizer. *J. Liposome Res.* 16, 113-125) y ácidos nucleicos (Lentz, Y.K., Anchordoquy, T.J., Lengsfeld, C.S., 2006. Rationale for the selection of an aerosol delivery system for gene delivery. *J. Aerosol Med.* 19, 372-384). Además, se recomienda en particular el nebulizador de malla vibratoria Aeroneb Pro para la administración de fármacos durante la ventilación mecánica (Pedersen, K.M., Handlos, V.N., Heslet, L., Kristensen, H.G.K., 2006. Factors influencing the *in vitro* deposition of tobramycin aerosol: a comparison of an ultrasonic nebulizer and a high-frequency vibrating mesh nebulizer. *J. Aerosol Med.* 19, 175-183). Los nebulizadores de malla vibratoria se dividen en dispositivos de malla vibratoria pasiva y activa (Newman, S., Gee-Turner, A., 2005. The Omron MicroAir Vibrating mesh technology nebuliser, a 21st century approach to inhalation therapy. *J. Appl. Ther. Res.* 5, 29-33). Los dispositivos de malla vibratoria pasiva (por ejemplo nebulizador Omron MicroAir NE-U22) emplean una placa perforada que tiene hasta 6000 orificios de sección transversal decreciente, de aproximadamente 3_min de diámetro. Un cristal piezoeléctrico vibratorio unido a un cuerno de transductor induce vibraciones “pasivas” en la placa perforada colocada en frente del mismo, dando como resultado la extrusión del fluido a través de los orificios y la generación del aerosol. Los dispositivos de malla vibratoria activa (por ejemplo, nebulizador Aeroneb Pro) pueden emplear un sistema de “microbomba” que comprende un generador de aerosol que consiste en una placa con hasta 1000 aberturas con forma de cúpula y un elemento vibratorio que se contrae y se expande al aplicar una corriente eléctrica. Esto da como resultado movimientos hacia arriba y hacia abajo de la malla en unos pocos micrómetros, extruyendo el fluido y generando el aerosol.

En administración pulmonar, la generación de partículas menores de aproximadamente 5 o 6 micrómetros se considera necesaria para lograr su deposición como fracción de partículas finas (FPF) (es decir, en los bronquiolos respiratorios y la región alveolar) (O’Callaghan, C., Barry, P.W., 1997. The science of nebulised drug delivery. *Thorax* 52, S31-S44).

Sin embargo, no solo el dispositivo es importante para la administración sistémica por medio de la vía pulmonar y/o

administración pulmonar del agente de la invención, sino que también la formulación correcta es crítica para lograr una administración eficaz. Esto puede lograrse en principio usando uno de los siguientes enfoques:

- 5 - Administración de disoluciones o suspensiones acuosas que comprenden el agente de la invención (por ejemplo, gotas nasales) dentro de las cavidades nasales;
- nebulización de disoluciones o suspensiones acuosas que comprenden el agente de la invención;
- 10 - atomización por medio de propelentes licuados; y
- dispersión de polvos secos.

Por tanto las formulaciones del agente de las invenciones tienen que adaptarse y ajustarse al dispositivo de inhalación elegido. Se describen formulaciones apropiadas, es decir los excipientes además del agente de la invención, por ejemplo en el capítulo IV de "Pulmonary Drug Delivery", Bechtold-Peters y Luessen, eds., citado anteriormente.

La solicitud también describe, en una realización específica, un método para administrar una cantidad eficaz de un Nanobody y/o constructo del mismo que puede unirse a y/o tener afinidad por al menos un antígeno, tal como se define en el presente documento. El método comprende la siguiente etapa:

20 a) administrar el Nanobody y/o constructo del mismo al tejido pulmonar de dicho mamífero.

Más particularmente, la solicitud describe, en una realización específica, un método para administrar una cantidad eficaz de un constructo de Nanobody que puede unirse a y/o tiene afinidad por al menos un antígeno, tal como se define en el presente documento. El método comprende la siguiente etapa:

25 a) administrar el Nanobody y/o constructo del mismo al tejido pulmonar de dicho mamífero; y en el que el constructo comprende al menos un Nanobody. El constructo puede comprender también más de un Nanobody, por ejemplo dos Nanobodies o tres Nanobodies.

Más particularmente, la solicitud describe, en una realización específica, un método para administrar una cantidad eficaz de un constructo de Nanobody que puede unirse a y/o tener afinidad por al menos un antígeno. El método comprende la siguiente etapa:

30 a) administrar el Nanobody y/o constructo del mismo al tejido pulmonar de dicho mamífero; y en el que el constructo comprende al menos un Nanobody. El constructo puede comprender también más de un Nanobody, por ejemplo dos Nanobodies o tres Nanobodies. Además, el constructo puede unirse a y/o tener afinidad por más de un antígeno, por ejemplo dos o tres antígenos en el que opcionalmente uno de los antígenos es albúmina sérica, por ejemplo albúmina sérica humana.

Además, la presente invención proporciona, en una realización específica, un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso en un método para la administración sistémica de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo que puede unirse a y/o tener afinidad por al menos un antígeno; y en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo tiene una biodisponibilidad comparable (por ejemplo, dentro del 10 % al 20 % superior o inferior) a la administración subcutánea equivalente. En una realización adicional, la biodisponibilidad es de al menos aproximadamente el 10 %, o el 20 %, o el 30 %, o el 40 % o el 50 % de la biodisponibilidad de la administración intravenosa equivalente (biodisponibilidad absoluta).

Otro aspecto de la invención es la estabilidad sorprendentemente duradera del dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo, en particular Nanobody y/o constructo del mismo. Por ejemplo, se ha encontrado que un Nanobody dirigido contra VRS sigue siendo funcional en el pulmón durante al menos 48 horas (véase la parte experimental). Por tanto, se cree que son posibles métodos de administración de la descripción con intervalos de dosificación de los agentes de la invención tales como una vez al día, una vez cada 2.^a, 3.^a, 4.^a, 5.^a, 6.^a o una vez cada semana, preferiblemente una vez al día, teniendo en cuenta la estabilidad duradera estimada, la biodisponibilidad potencial y la semivida en la circulación sistémica.

Se ha encontrado sorprendentemente que, en vista de la alta biodisponibilidad de la administración sistémica de los agentes de la invención, por ejemplo tal como se muestra en la parte experimental de esta solicitud, y la liberación controlada duradera (por ejemplo. la farmacocinética de pseudoequilibrio con semivida terminal larga relativa tal como se muestra en la parte experimental) en la circulación sistémica, pueden ser posibles intervalos de dosificación de una vez al día, o mayores, por ejemplo cada 2.^a, 3.^a, 4.^a, 5.^a, 6.^a o una vez a la semana, preferiblemente una vez al día. En particular, pueden ser viables intervalos de dosificación del agente de la invención que comprende, por ejemplo, un aglutinante de albúmina sérica, por ejemplo aglutinante de albúmina sérica humana, tal como se describe en la frase anterior. Esto subraya la ventaja particular de la presente invención de dar como resultado un

dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso en un método de administración fácil de usar, no invasivo que proporciona una exposición sistémica duradera del agente de la invención que permite una dosificación de una vez al día o un intervalo mayor, por ejemplo una dosificación de hasta una vez a la semana. No podía predecirse a partir de la técnica anterior que tales ventajas puedan obtenerse usando la vía de administración pulmonar, en particular ya que la técnica anterior sugiere que la administración sistémica por medio de la vía pulmonar es mínima (documento WO2007/049017).

Dosis:

La dosificación apropiada dependerá por supuesto de, por ejemplo, la inhalación/formulación empleada, el huésped y la naturaleza y gravedad del estado que está tratándose. Sin embargo, en general, se indica que se obtienen resultados satisfactorios en animales a una dosificación diaria de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal del animal. En mamíferos más grandes, por ejemplo humanos, una dosificación diaria indicada está en el intervalo de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 200 mg, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg del compuesto administrado convenientemente tal como se describe en el presente documento.

La presente descripción proporciona además una composición farmacéutica para la administración pulmonar prevista para administración pulmonar pero en particular también para administración sistémica que comprende un agente de la invención en asociación con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden formularse de una manera convencional tal como se describe y/o se le hace referencia, por ejemplo, en el presente documento. Las formas de dosificación unitaria contienen, por ejemplo, desde aproximadamente 0,25 hasta aproximadamente 10 mg, de manera preferible aproximadamente 1 mg, de un agente según la invención.

Los principios generales de la presente invención tal como se expusieron anteriormente se ejemplificarán ahora mediante referencia a experimentos específicos. Sin embargo, la invención no debe entenderse como que está limitada a los mismos.

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Gráfico de concentración plasmática observada individual (i.v.) y media (i.t.)-tiempo de ALX-0081 (i.v. 5 mg/kg; i.t. 3,1 mg/kg).

35 Figura 2: Gráfico de concentración plasmática observada individual (i.v.) y media (i.t.)-tiempo de RANKL008A (i.v. 5 mg/kg; i.t. 3,2 mg/kg).

Figura 3: Gráfico de concentración plasmática observada individual (i.v.) y media (i.t.)-tiempo de NB2 de VRS (i.v. 4 mg/kg; i.t. 3,6 mg/kg).

40 Figura 4: gráfico de concentración plasmática observada individual-tiempo de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única dosis en bolo i.v. de NB2 de VRS (4 mg/kg), ALX-0081 (5 mg/kg) y RANKL008A (5 mg/kg), respectivamente a ratas Wistar macho.

45 Figura 5: Perfiles de concentración en BALF observada media (+DE)-tiempo de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única administración intratraqueal de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas macho.

50 Figura 6: Los Nanobodies administrados por vía pulmonar son estables en el pulmón durante al menos 24 h tras la administración.

Figura 7: Biodisponibilidad en plasma de Nanobodies administrados por vía pulmonar frente a administrados por vía i.v.

55 Figura 8: La inoculación intranasal del Nanobody bivalente 191-D3 (RSV101) impide la infección y replicación *in vivo* de la cepa de VRS A2. Títulos de VRS infeccioso en los homogenados de pulmón (ufp/pulmón) preparados tres y cinco días tras la infección (límite de detección por debajo de 100 UFP).

60 Figura 9: El Nanobody funcional RSV101 sigue siendo detectable durante al menos 3 días tras la inoculación intranasal en ratones.

Figura 10: Títulos neutralizantes de virus de suero de llama tras la inmunización con hemaglutinina.

Figura 11: Ensayo de unión con una serie de dilución de Nanobodies anti-HA H5 purificados.

65

Figura 12: Competición de fracciones periplásmicas con fetuína por la unión a la hemaglutinina.

Figura 13: Competición de Nanobodies purificados con fetuina por la unión a la hemaglutinina.

Figura 14: Identificación del Nanobody neutralizante 202-C8.

5

Figura 15: Identificación de los Nanobodies neutralizantes 203-B12 y 203-H9.

Figura 16: Las combinaciones de Nanobodies 202-C8, 203-H9 y 203-B12 no dan como resultado una neutralización aumentada.

10

Figura 17: La administración intranasal del Nanobody 202-C8 protege frente a la infección y replicación de virus NIBRG-14 adaptado a ratón.

Figura 18: El Nanobody (202-c8)₂ reduce la replicación viral cuando se administra hasta 72 horas tras la infección viral. Se determinaron los títulos infecciosos (TCID₅₀/ml) y el ARN viral en los pulmones 96 horas tras la infección viral. Se calculó el % de reducción comparando con los títulos infecciosos y niveles de ARN de ratones tratados con el Nanobody de control (191D3)₂.

15

Figura 19: El Nanobody (202-C8)₂ previene la reducción inducida por virus del peso corporal cuando se administra hasta 48 horas tras la exposición viral. Se muestra una comparación de los pesos corporales a las 96 horas p.i. como el % del peso corporal inicial.

20

Figura 20: Configuración del modelo de esplenocitos de ratón *in vivo* agudo.

25

Figura 21: Gráfico que muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 7 para la inhibición de la síntesis de mIL-22 en un ensayo de esplenocitos de ratón tras la administración de P23IL0075 por medio de diferentes vías de administración, es decir i.t. y s.c. (A) Nivel basal, es decir sin mIL-22 de inducción; (B) administración s.c. de PBT; (C) administración s.c. de P23IL0075; (D) administración i.t. de PBT; (E) administración i.t. de P23IL0075 (dosis baja); (F) administración i.t. de P23IL0075 (dosis alta); (G) administración i.t. de P23IL0075 (dosis alta, otro tampón).

30

Figura 22: Administración i.t. e i.p. del constructo de nanobody 4.10-Alb1 en ratones. (a) Constructo de Nanobody 4.10-Alb1 en la circulación tras la administración i.p. e i.t.; (b) niveles de leptina antes y después de la administración i.t. del constructo de Nanobody 4.10-Alb1; (c) niveles de leptina antes y después de la administración i.p. del constructo de Nanobody 4.10-Alb1.

35

Figura 23: Aumento dependiente de la dosis de los niveles circulantes de leptina tras la administración i.t. de 4 cantidades crecientes de constructos de Nanobody 4.10-Alb1. (a) Se detectaron constructos de Nanobody 4.10-Alb1 e IL6R202 en la sangre tras cada inoculación i.t. o i.p.; (b) niveles de leptina tras la inyección de 4.10-Alb1 y control de IL6R202; (c) niveles de leptina tras la administración i.t. de 4.10-Alb1 y control de IL6R202.

40

Figura 24: Aumento del peso corporal tras la administración i.t. de 4 cantidades crecientes de Nanobodies 4.10. (a) Aumento del peso corporal con 4.10-Alb1 (también denominado "4.10") por medio de inyecciones i.p.; (b) ausencia de aumento del peso corporal con IL6R202 por medio de inyección i.p.; (c) aumento del peso corporal con 4.10-Alb1 (también denominado "4.10") por medio de administración i.t.; (d) ausencia de aumento del peso corporal con IL6R202 por medio de administración i.t.; (e) el modelo mixto es un buen modelo para los niveles de peso corporal; (f) y(g) modelo de peso corporal con bandas de confianza correspondientes (4.10-HLE intratraq. = 4.10-Alb1 administración i.t.; contr. intratraq. = IL6R202 administración i.t.; 4.10-HLE i.p. = 4.10-Alb1 inyección i.p.; contr. i.p. = IL6R202 inyección i.p.).

50

Parte experimental

Ejemplo 1: Farmacocinética de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A en la rata Wistar macho tras administración individual intratecal o intravenosa

55

1.1: Tabla B-1 - elementos de prueba:

Nombre	Nombres alternativos	SEQ ID NO:	Referencia	Secuencia de aminoácidos
NB2 de VRS	191D3	1	SEQ ID NO: 159 en el documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTYSRYG MGWFRQAPGKEREFVAAVSRLSGPRTVYADSVK GRFTISRDN AENTVYLQMNSLKPEDTAVYTCAAEL TNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSS

ALX-0081	12A2H1-3a-12A2H1	2	SEQ ID NO: 98 en el documento WO20061228 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNP MGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEG RFTISRDNARMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAG VRAEDGRVRTLPSEYTFWGGGTQVTVSSAAAEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMG WFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFT ISRDNARMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRA EDGRVRTLPSEYTFWGGGTQVTVSS
RANKL 008a		3	SEQ ID NO: 759 en el documento WO 2008142164	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPM GWFRQAPGKGRELVSSITGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRP DTYLSRDYRKYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYLADSVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL SRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGR REFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTL YLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDTYLSRDYRKY DYWGQGLTVTVSS

Modelo animal

5 Se usaron 101 ratas Wistar macho (aproximadamente 300 gramos y 11 semanas de edad) para este estudio, una raza criada por Charles River Laboratories, Alemania. Se mantuvieron los animales durante al menos 6 días para adaptación. Tras la comprobación inicial de salud, se pesaron los animales y se asignaron por medio de un programa de aleatorización informatizado a los grupos de prueba; solo se usaron animales sanos.

10 Se descongelaron las sustancias de prueba estériles en un baño de agua a 25 °C mientras se removía suavemente durante 10 minutos. Para la dosificación intratecal, no se requirieron diluciones adicionales. Para la administración intravenosa, se diluyó de manera aséptica la cantidad requerida de sustancia de prueba en DPBS estéril (solución salina tamponada con fosfato (modificada con Dulbecco)) hasta las concentraciones deseadas. Se prepararon nuevas las formulaciones de elementos de prueba en el plazo de 4 horas antes de la dosificación.

15 *Dosis y vía de administración*

Se proporcionan los diferentes grupos de prueba y los niveles de dosis en la tabla B-2. Se administró la dosis en bolo i.v. a una vena de la cola. Se ajustó la cantidad de elemento de prueba para administración i.v. al peso corporal actual de cada animal. Se administró la dosis i.t. por vía intratecal con una jeringa con una aguja para dosificación de acero inoxidable roma, tras anestesia profunda con isoflurano. Se estableció la cantidad de elemento de prueba para administración i.t. a 100 µl/animal, independientemente del peso corporal. El peso corporal promedio de los animales con administración por vía intratecal se encontraba en promedio en 0,315 kg (grupo con NB2 de VRS), 0,317 kg (grupo con ALX-0081), 0,323 kg (grupo con RANKL008A), correspondiente con una dosis media por peso corporal se calcularon a 3,6 mg/kg (grupo con NB2 de VRS), 3,1 mg/kg (grupo con ALX-0081), 3,2 mg/kg (grupo con RANKL008A),

Tabla B-2: Diseño del estudio

Grupo	Sustancia	Vía	Dosis única (mg/kg)	Número de animales
1	NB2 de VRS	i.v.	4	3
2	ALX-0081	i.v.	5	3
3	RANKL008A	i.v.	5	3

4	NB2 de VRS	i.t.	3,6	28
5	ALX-0081	i.t.	3,1	28
6	RANKL008A	i.t.	3,2	28
7	-	-	-	8

Muestreo y procesamiento de sangre y BALF.

Tras la dosificación i.v., se muestreó sangre (aproximadamente 300 µl) a 0,05, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas de la vena de la cola de animales a los que se administró NB2 de VRS y ALX-0081 y a 0,05, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas de animales a los que se administró RANKL008A. Se colocaron todas las muestras de sangre sobre hielo fundente. En el plazo de aproximadamente 30 minutos tras el muestreo, se centrifugaron las muestras de sangre a 5 °C durante 10 minutos (1500 g). Se almacenó plasma citrado en tubos de polipropileno a aproximadamente ≤ -75 °C hasta el envío sobre hielo seco al patrocinador.

Tras la dosificación intratecal, se recogieron sangre, pulmones y BALF (en la necropsia tras anestesia profunda con isoflurano) a 0,05, 0,333, 1, 2, 4, 6 y 24 horas de ratas a las que se administró NB2 de VRS y ratas a las que se administró ALX-0081 y a 0,05, 0,333, 1, 2, 4, 8 y 24 horas de animales a los que se administró RANKL008A. Por medio de una punción de la aorta, se extrajeron 4 ml de sangre. En el plazo de 42 minutos tras el muestreo, se centrifugaron las muestras de sangre a 5 °C durante 10 minutos (1500 g). Se almacenó plasma citrado en tubos de polipropileno a aproximadamente ≤ -75 °C hasta el envío sobre hielo seco al patrocinador. Tras la extracción de sangre, se recogieron los pulmones. En primer lugar, se aclararon los pulmones incluyendo la tráquea con DPBS helado y se pesaron. Entonces, se recogió BALF. Se pusieron cuidadosamente cinco ml de líquido de lavado (DPBS) en los pulmones. Después de aproximadamente 10 segundos, se devolvió todo el líquido posible a la jeringa. Se transfirió BALF a un tubo vacío y se almacenó directamente sobre hielo fundente. Se repitió este procedimiento. Se añadió la segunda recogida de BALF a la primera recogida. Se documentó el volumen de BALF que se había recogido y se notificó. Posteriormente, se almacenó BALF a aproximadamente ≤ -75 °C hasta el envío sobre hielo seco al patrocinador.

Determinación de NB2 de VRS en BALF o plasma de rata

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc-) durante la noche a 4 °C con 100 µl de VRSh (12,5 µg/ml, Hytest). Después de eso, los pocillos se aspiraron, se bloquearon (TA, 1 h, PBS-caseína al 0,1 %) y se lavaron. Se prepararon los patrones, QC y prediluciones de las muestras de prueba en una placa no recubierta (polipropileno) en el 100 % de BALF o plasma de rata y se incubaron durante 30 min a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Se transfirió una dilución 1/10 de las muestras en PBS-caseína al 0,1 % (la concentración final de BALF o plasma de rata es del 10 %) a la placa recubierta y se incubó durante 1 h a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Después de tres etapas de lavado con PBS-Tween20 al 0,05 %, se incubaron las placas con anticuerpo monoclonal K1 anti-Nanobody policlonal de conejo (1/2000 en PBS-caseína al 0,1 %, interno) durante 1 h a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween20 al 0,05 %, se incubaron 100 µl de anticuerpo policlonal caprino contra inmunoglobulinas de conejo marcado con peroxidasa del rábano (HRP) (1/2000 en PBS-caseína al 0,1 %, DakoCytomation) durante 1 h a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Se realizó la visualización cubierta de la luz durante 20 min con 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (esTMB, SDT, diluida 1/3). Después de 20 min, se detuvo la reacción de coloración con 100 µl de HCl 1 N. Se determinó la absorbancia a 450 nm y se corrigió para la absorbancia de fondo a 620 nm. Se determinó la concentración en cada muestra basándose en una curva patrón sigmoidea. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el límite superior de cuantificación (ULOQ) de los diferentes ensayos se indican en la tabla B-3.

Tabla B-3: LLOQ y ULOQ para la determinación de NB2 de VRS en muestras de BALF y plasma de rata

ELISA de PK	LLOQ (ng/ml)		ULOQ (ng/ml)	
	Nivel de placa	Nivel de plasma/BALF	Nivel de placa	Nivel de plasma/BALF
NB2 de VRS	0,4	4,0	20,0	200,0

Determinación de ALX-0081 en BALF o plasma de rata

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) durante la noche a 4 °C con 100 µl de vWF en PBS (2,5 µg/ml, Haemate P1200/500 - ZLB Behring). Después de eso, los pocillos se aspiraron, se bloquearon (TA, 1 h, PBS-caseína al 0,1 %) y se lavaron. Se prepararon los patrones, QC y prediluciones de las muestras de prueba en una placa no recubierta (polipropileno) en el 100 % de BALF o plasma de rata y se incubaron durante 30 min a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Se transfirió una dilución 1/5 de las muestras en PBS-caseína al 0,1 % (la concentración final de BALF o plasma de rata es del 20 %) a la placa recubierta y se incubó durante 1 h a TA

mientras se agitaba a 600 rpm. Después de tres etapas de lavado con PBS-Tween20 al 0,05 %, se incubaron las placas con el anti-ALX0081 NB vWF12B2-GS9-12B2-BIO (1 µg/ml en PBS-caseína al 0,1 %, interno) durante 30 min a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween20 al 0,05 %, se incubaron 100 µl de estreptavidina-HRP (1/2000 en PBS-caseína al 0,1 %, DakoCytomation) durante 30 min a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Se realizó la visualización cubierta de la luz durante 15 min con 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (esTMB, SDT, diluida 1/3). Después de 15 min, se detuvo la reacción de coloración con 100 µl de HCl 1 N. Se determinó la absorbancia a 450 nm y se corrigió para la absorbancia de fondo a 620 nm. Se determinó la concentración en cada muestra basándose en una curva patrón sigmoidea. El LLOQ y el ULOQ de los diferentes ensayos se indican en la tabla B-4.

Tabla B-4: LLOQ y ULOQ para la determinación de ALX-0081 en muestras de BALF y plasma de rata

ELISA de PK	LLOQ (ng/ml)		ULOQ (ng/ml)	
	Nivel de placa	Plasma/BALF	Nivel de placa	Plasma/BALF
ALX-0081	0,75	3,75	40,0	200,0

Determinación de RANKL008A en BALF o plasma de rata

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) durante la noche a 4 °C con 100 µl de neutravidina en PBS (2 µg/ml, Pierce,). Se aspiraron los pocillos y se bloquearon. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween20 al 0,05 %, se capturó RANKL biotilado (0,5 µg/ml en PBS-caseína al 0,1 %, interno) incubando 100 µl durante 1 h a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Después de esta etapa de incubación, se lavaron los pocillos. Se prepararon los patrones, QC y prediluciones de las muestras de prueba en una placa no recubierta (polipropileno) en el 100 % de BALF o plasma de rata y se incubaron durante 30 min a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Se transfirió una dilución 1/10 de las muestras en PBS-caseína al 0,1 % (la concentración final de BALF o plasma de rata es del 10 %) a la placa recubierta y se incubó durante 1 h a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Después de tres etapas de lavado con PBS-Tween20 al 0,05 %, se incubaron las placas con anticuerpo monoclonal R23 anti-Nanobody® policlonal de conejo (1/2000 en PBS-caseína al 0,1 %, interno) durante 1 h a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween20 al 0,05 %, se incubaron 100 µl de anticuerpo policlonal caprino contra inmunoglobulinas de conejo marcado con peroxidasa del rábano (HRP) (1/5000 en PBS-caseína al 0,1 %, DakoCytomation) durante 1 h a TA mientras se agitaba a 600 rpm. Se realizó la visualización cubierta de la luz durante 10 min con 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (esTMB, SDT, diluido 1/3). Tras 10 min, se detuvo la reacción de coloración con 100 µl de HCl 1 N. Se determinó la absorbancia a 450 nm y se corrigió para la absorbancia de fondo a 620 nm. Se determinó la concentración en cada muestra basándose en una curva patrón sigmoidea. El LLOQ y el ULOQ de los diferentes ensayos se indican en la tabla B-5.

Tabla B-5: LLOQ y ULOQ para la determinación de RANKL008A en muestras de BALF y plasma de rata

ELISA de PK	LLOQ (ng/ml)		ULOQ (ng/ml)	
	Nivel de placa	Plasma/BALF	Nivel de placa	Plasma/BALF
RANKL008A	0,1	1,0	7,5	75,0

Análisis de datos farmacocinéticos no compartimentales

Se sometieron los perfiles de concentración en el tiempo de plasma individual y BALF medio de todas las ratas a un análisis farmacocinético no compartimental (NCA) usando el software profesional WinNonlin versión 5.1 (Pharsight Corporation, Mountain Vista California, EE. UU.). Se usaron los modelos preprogramados 200 y 201 para analizar los datos intratecales e intravenosos, respectivamente. Se usó la regla trapezoidal lineal arriba/abajo para calcular el área debajo de los datos de concentración en el tiempo. Se consideraron tiempos nominales excepto cuando el tiempo real se desviaba más del 5 % del nominal, se usó el tiempo real. En el cálculo de la t1/2, se consideraron al menos 3 puntos de datos excepto cuando se indicó. Cuando estaban disponibles al menos tres valores individuales, se calcularon la media y la DE.

1.3 Resultados

Concentraciones plasmáticas de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A

Los datos de concentración plasmática en el tiempo observados de los animales individuales tras una única administración i.v. y de los datos de concentración plasmática en el tiempo medios (n = 4 animales/punto de tiempo; muestreo destructivo) tras una única administración i.t. de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A se muestran en la figura 4 (datos i.v. para todos los compuestos), figura 3 (datos i.v. e i.t. de NB2 de VRS), figura 1 (datos i.v. y i.t. de

ES 2 701 649 T3

ALX-0081) y figura 1 (datos i.v. y i.t. de RANKL008A). Las concentraciones plasmáticas individuales (i.v.) y tanto individuales como medias (i.t.) se enumeran en las tablas B-6, B-7 y B-8, respectivamente.

5 Tabla B-6: Datos individuales de concentración plasmática en el tiempo de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única dosis en bolo i.v. de NB2 de VRS (4 mg/kg), ALX-0081 (5 mg/kg) y RANKL008A (5 mg/kg), respectivamente, a ratas Wistar macho

Concentración plasmática tras administración i.v. (µg/ml)									
Tiempo nominal	NB2 de VRS			ALX-0081			RANKL008A		
	ID 1	ID 2	ID 3	ID 4	ID 5	ID 6	ID 7	ID 8	ID 9
3 min	23,6	34,5	32,1	60,4	63,2	NS	94,3(1)	107	100
15 min	5,16	10,7	10,6	9,18	14,1	NS	95,7	94,8	92,8
30 min	3,61	5,91	3	3,15	3,37	4,55	88,4	85,9	74,1
1 h	NS(2)	5,12	2,36	1,09	1,31	1,84	81,5	73,8	NS
2 h	NS	NS	0,763	0,498	0,594	NS	58,7	55,9	NS
4 h	NS	NS	0,161	0,219	0,315	0,328	35,8	35,1	NS
6 h	NS	NS	0,056	0,125	0,161	0,116	/	/	/
8 h	/(3)	/	/	/	/	/	17,1	18,8	NS
24 h	BQL(4)	NS	BQL	BQL	BQL	BQL	3,17	3,94	NS
48 h	/	/	/	/	/	/	0,902	0,988	NS

(1) 5 min en lugar de 3 min
(2) NS: No pudo obtenerse ninguna muestra debido a dificultades técnicas)
(3) Sin muestreo por protocolo
(4) BQL: Por debajo del límite de cuantificación

10 Tabla B-7: Datos individuales de concentración plasmática en el tiempo de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única dosis i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg), respectivamente, a ratas Wistar macho.

Concentración plasmática tras administración i.t. (µg/ml)						
Tiempo nominal	NB2 de VRS		ALX-0081		RANKL008A	
	ID	Concentración	ID	Concentración	ID	Concentración
3 min(1)	10	0,158	38	0,056	66	0,004
	11	0,085	39	0,013	67	0,030
	12	0,081	40	0,029	68	0,006
	13	0,127	41	0,077	69	0,005
20 min	14	0,204	42	0,102	70	0,072
	15	0,167	43	0,102	71	0,081
	16	0,131	44	0,097	72	0,151
	17	0,267	45	0,070	73	0,083
1 h	18	0,202	46	0,122	74	0,401
	19	0,167	47	0,112	75	0,541
	20	0,120	48	0,049	76	0,305
	21	0,120	49	0,109	77	1,077
2 h	22	BQL	50	0,041	78	0,279
	23	0,230	51	0,100	79	0,389
	24	0,091	52	0,084	80	0,705
	25	0,202	53	0,091	81	0,489
4 h	26	0,113	54	0,069	82	0,965
	27	0,150	55	0,077	83	0,601
	28	0,080	56	0,053	84	0,934
	29	0,129	57	0,085	85	0,672
6/8 h(3)	30	0,125	58	0,034	86	0,869

ES 2 701 649 T3

	31	0,071	59	0,048	87	1,42
	32	0,108	60	0,070	88	1,16
	33	0,091	61	0,059	89	0,606
24 h	34	0,024	62	0,014	90	0,493
	35	0,024	63	0,022	91	0,450
	36	0,025	64	0,014	92	0,434
	37	0,036	65	0,020	93	0,342
(1) 4 min en lugar de 3 min						
(2) BQL: por debajo del límite de cuantificación						
(3) 6 h para NB2 de VRS y ALX-0081, 8 h para RANKL008A.						

Tabla B-8: Datos de concentración plasmática en el tiempo medios ($n = 4$) de NB2 de VRS, ALX-0081, y RANKL008A tras una única dosis i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg), respectivamente, a ratas Wistar macho.

5

Concentración plasmática tras administración i.t. ($\mu\text{g/ml}$)						
NB2 de VRS (ID 10-37)			ALX-0081 (ID 38-65)		RANKL008A (ID 66-93)	
Tiempo nominal	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
3 min	0,113	0,037	0,044	0,028	0,012	0,013
20 min	0,192	0,058	0,093	0,015	0,097	0,037
1 h	0,152	0,040	0,098	0,033	0,581	0,345
2 h	0,175(1)	0,074	0,079	0,026	0,465	0,181
4 h	0,118	0,030	0,071	0,014	0,793	0,184
6 h	0,099	0,023	0,052	0,015	/(1)	/
8 h	/	/	/	/	1,01	0,35
24 h	0,027	0,006	0,018	0,004	0,430	0,063
(1) $N = 3$						
(2) Sin muestreo planeado por protocolo						

Análisis farmacocinético en plasma de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A

10

En las tablas B9-B11 se proporciona una visión general de los parámetros farmacocinéticos básicos obtenidos mediante análisis PK no compartimental de NB2 de VRS (4 mg/kg i.v. y 3,6 mg/kg i.t.), ALX-0081 (5 mg/kg i.v. y 3,1 mg/kg i.t.) y RANKL008A (5 mg/kg i.v. y 3,2 mg/kg i.t.).

15

Tabla B-9: Parámetros farmacocinéticos básicos individuales de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única dosis i.v. de NB2 de VRS (4 mg/kg), ALX-0081 (5 mg/kg) y RANKL008A (5mg/kg) a ratas Wistar macho.

i.v.: NB2 de VRS 4 mg/kg; ALX-0081/RANKL008A 5 mg/kg						
Parámetro	Unidad	ALX-0081 ID 4	ALX-0081 ID 5	RANKL008A ID 7	RANKL008A ID 8	NB2 de VRS ID 3
C(0)	ug/ml	96,7	92,0	94,3	110	42,3
Vss	ml/kg	255	250	91,5	92,8	250
CL	ml/h/kg	363	311	9,17	8,82	363
MRT	h	0,702	0,804	9,98	10,5	0,690
t1/2 λ_z	h	2,01	2,12	13,2(1)	12,0(1)	0,926
λ_z inferior	h	2	2	24	24	0,5
λ_z superior	h	6	6	48	48	6
AUClast	h*ug/ml	13,4	15,6	528	550	11,0

ES 2 701 649 T3

AUCextrap	%	2,51	3,09	3,16	3,03	0,560
AUCinf	h*ug/ml	13,8	16,1	545	567	11,0
AUCinf/D	h*kg/ml	0,0028	0,0032	0,1091	0,1134	0,0028
(1) Solo se consideraron 2 puntos de datos						

Tabla B-10: Parámetros farmacocinéticos básicos medios de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única dosis i.v. de NB2 de VRS (4 mg/kg), ALX-0081 (5 mg/kg) y RANKL008A (5mg/kg) a ratas Wistar

i.v.: NB2 de VRS 4 mg/kg; ALX-0081/RANKL008A 5 mg/kg						
Parámetro	Unidad	ALX-0081		RANKL008A		NB2 de VRS
		Promedio	% de CV	Promedio	% de CV	
C(0)	ug/ml	94,3	4	102	11	42,3
Vss	ml/kg	252	1	92,1	1	250
CL	ml/h/kg	337	11	9,00	3	363
MRT	h	0,753	10	10,2	4	0,690
t1/2 λz	h	2,06	4	12,6(1)	7	0,926
λz inferior	h	2	0	24	0	0,5
λz superior	h	6	0	48	0	6
AUClast	h*ug/ml	14,5	10	539	3	11,0
AUCextrap	%	2,80	15	3,09	3	0,560
AUCinf	h*ug/ml	14,9	11	556	3	11,0
AUCinf/D	h*kg/ml	0,003	9	0,111	3	0,003
(1) Solo se consideraron 2 puntos de datos						

5

Tabla B-11: Parámetros farmacocinéticos básicos de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única dosis i.v. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar.

Administración i.t.				
Parámetro	Unidad	ALX-0081 3,1 mg/kg	RANKL008A 3,2 mg/kg	NB2 de VRS 3,6 mg/kg
Vss/F	ml/kg	36339	2833	21853
CL/F	ml/h/kg	2407	130	1641
MRT	h	15,1	21,7	13,3
t1/2 λz	h	10,5	13,0(1)	9,48
λz inferior	h	2	8	4
λz superior	h	24	24	24
AUClast	h*ug/ml	1,02	16,5	1,83
AUCextrap	%	20,8	32,8	16,8
AUCinf	h*ug/ml	1,29	24,6(2)	2,19
tmáx	h	1	8	0,330
Cmáx	ug/ml	0,098	1,01	0,192
AUCinf/D	h*kg/ml	0,0004	0,0077	0,0006

F	%	13,9	6,90	22,1
(1) Solo se consideraron 2 puntos de datos (2) Interpretar con precaución debido al alto % de AUC extrapolado $V_{ss}/F = MRT \cdot CL$ (MRT no corregido para MAT) Estimación F incorrecta si CL i.v. y CL i.t. son diferentes; Nota dosis i.v. ≠ i.t.				

Se obtuvieron los parámetros PK comentados en el presente documento usando análisis no compartimental (NCA). Para la rata 1 y 2 (NB2 de VRS i.v.), rata 6 (ALX-0081 i.v.) y rata 9 (RANKL008A i.v.) se produjeron dificultades en el muestreo de sangre, y debido a los datos limitados, estos animales se excluyeron de posteriores cálculos farmacocinéticos. Los parámetros terminales para algunos de los animales se calcularon basándose en solo dos puntos de datos (R^2 indicado en rojo en las tablas) en la fase terminal, y deben por tanto interpretarse con precaución.

Tras la administración i.v. de NB2 de VRS (4 mg/kg) y ALX-0081 (5 mg/kg) se observaron perfiles PK en plasma comparables (figura 7). Esto también se reflejó en parámetros farmacocinéticos similares para el NB2 de VRS monovalente y ALX-0081 bivalente. El aclaramiento medio se estimó a 363 ml/h/kg y 337 ml/h/kg para ratas a las que se administró NB2 de VRS y ALX-0081. Los valores V_{ss} medios correspondientes fueron 250 ml/kg (NB2 de VRS) y 252 ml/kg (ALX-0081). Las concentraciones plasmáticas de estos Nanobodies® fueron solo detectables hasta seis horas (límites de detección de aproximadamente 4 ng/ml) y se calcularon las semividas terminales a 0,926 horas para NB2 de VRS y 2,06 horas para ALX-0081. Para el RANKL008A trivalente administrado por vía intravenosa (5 mg/kg), se calcularon valores de aclaramiento medio sustancialmente menores (9,00 ml/h/kg) y V_{dss} (92,1 ml/kg). Las semividas terminales fueron notablemente mayores (12,6 horas). Esto se explica por el hecho de que RANKL008A es un Nanobody de semivida prolongada (mediante la unión del componente ALB8) que tiene reactividad cruzada con albúmina de rata, aunque con menor afinidad en relación con albúmina sérica humana.

Tras la administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg), se observaron semividas terminales comparables en el plasma para los tres Nanobodies® (NB2 de VRS: 9,48 h, ALX-0081: 10,5 h y RANKL008A: 13,0 h). Para NB2 de VRS y ALX-0081 las semividas fueron mayores tras la administración i.t. que tras administración i.v. Es concebible que para estos compuestos rápidamente aclarados, la absorción sea la etapa limitante de velocidad que da como resultado cinética flip-flop (es decir, la cinética está controlada por la velocidad de absorción y la fase terminal está impulsada por la lenta absorción desde el sitio de administración (el pulmón) hasta la circulación sistémica).

La exposición tras la administración i.t. fue menor para todos los Nanobodies que en comparación con la de después de la administración i.v. Estas biodisponibilidades resultantes fueron del 22,1 %, el 13,9 % y el 6,9 % para NB2 de VRS (16,6 kD), ALX-0081 (27,9 kD) y RANKL008A (40,9 kD), respectivamente. La biodisponibilidad parece disminuir con el peso molecular creciente, pero esta tendencia necesita confirmarse cuando estén disponibles más datos.

Para aplicaciones tópicas al pulmón (NB2 de VRS), se desea una elevada exposición pulmonar. Podría esperarse que una absorción más rápida y más completa (que da como resultado una mayor biodisponibilidad) no se beneficiara de la exposición pulmonar. Por tanto, Nanobodies de VRS con un mayor peso molecular (por ejemplo, un Nanobody de VRS trivalente) podrían conducir posiblemente a exposiciones (pulmonares) locales potenciadas y exposiciones sistémicas reducidas.

Los datos actuales indican que la exposición sistémica a Nanobodies puede lograrse tras administración intratraqueal, lo que sugiere que la vía pulmonar puede ser viable como método no invasivo de administración de Nanobodies. Además, el uso de formulaciones y/o dispositivos de administración específica podría mejorar significativamente la biodisponibilidad tras la aplicación pulmonar. Se sugiere que la biodisponibilidad puede mejorarse aproximadamente 5 veces en animales (i.t. frente a aerosol, véase, por ejemplo, la tabla 2 en Patton J., Fishburn S., Weers J. The Lung as a Portal of Entry for Systemic Drug Delivery. 2004. Proc Am Thorac Soc vol. 1. págs. 338-344).

Concentraciones en BALF de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A

En la figura 5 se muestran los perfiles de concentración en BALF en el tiempo observados medios tras una única administración intratraqueal de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A a ratas macho. Se enumeran concentraciones en BALF individuales y medias en las tablas B-12 y B-13, respectivamente.

Tabla B-12: Concentraciones en BALF individuales observadas de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas macho.

Concentraciones en BALF tras la administración i.t. ($\mu\text{g/ml}$)
--

ES 2 701 649 T3

Tiempo nominal	NB2 de VRS		ALX-0081		RANKL008A	
	ID	Concentración	ID	Concentración	ID	Concentración
3 min(1)	10	46,2	38	145	66	32,3
	11	65,0	39	57,9	67	56,1
	12	23,0	40	69,2	68	27,0
	13	36,7	41	115	69	80,2
20 min	14	32,8	42	40,4	70	14,4
	15	54,8	43	148	71	87,9
	16	70,2	44	93,4	72	43,3
	17	68,1	45	55,7	73	22,4
1 h	18	134	46	179	74	124
	19	50,7	47	80,6	75	70,3
	20	35,8	48	62,4	76	33,8
	21	18,4	49	35,8	77	49,8
2 h	22	BQL(2)	50	33,7	78	16,1
	23	22,1	51	36,9	79	58,3
	24	26,1	52	111	80	49,0
	25	32,6	53	37,1	81	22,3
4 h	26	14,9	54	32,7	82	24,8
	27	60,9	55	2,44	83	11,4
	28	45,0	56	85,1	84	95,0
	29	4,81	57	50,5	85	24,9
6/8 h(3)	30	24,4	58	36,2	86	15,6
	31	43,6	59	90,1	87	42,1
	32	21,6	60	51,9	88	72,4
	33	33,1	61	74,6	89	30,2
24 h	34	9,53	62	20,9	90	32,7
	35	19,1	63	13,2	91	14,6
	36	10,7	64	16,5	92	7,48
	37	17,0	65	14,6	93	6,91
(1) 4 min en lugar de 3 min (2) Por debajo del límite de cuantificación (3) 6 h para NB2 de VRS y ALX-0081; 8 h para RANKL008A						

Tabla B-13: Concentraciones en BALF medias observadas de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A tras una única administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas macho.

Concentración en BALF tras la administración i.t. (µg/ml)						
Tiempo nominal	ALX-0081 (ID 38-65)		RANKL008A (ID 66-93)		NB2 de VRS (ID 10-37)	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
3 min	96,8	40,4	48,9	24,4	42,7	17,6
20 min	84,3	47,9	35,7	32,9	56,5	17,2
1 h	89,4	62,4	69,4	39,2	59,7	51,1
2 h	54,6	37,5	36,4	20,4	26,9	5,3
4 h	42,7	34,6	39	37,9	31,4	26,1
6 h	63,2	23,9	40,1	24,1	/(2)	/
8 h	/	/	/	/	30,7	9,9
24 h	16,3	3,4	15,4	12,1	14,1	4,7

- (1) 4 min en lugar de 3 min
 (2) Ningún muestreo programado

5 Las semividas terminales de los tres Nanobodies en BALF se basaron en los dos últimos puntos de datos únicamente, y deben, por tanto, interpretarse con precaución. También cabe destacar que hubo bastante variabilidad interindividual tal como se indica mediante las grandes desviaciones estándar (véase la tabla B-13). Tras la administración i.t., se observaron semividas terminales comparables en plasma (NB2 de VRS 9,48 h, ALX-0081 10,5 h y RANKL008A 13,0 h) y en BALF (NB2 de VRS 16,0 h, ALX-0081 9,21 h y RANKL008A 11,6 h), apoyando la noción que la cinética del plasma está controlada probablemente por la tasa de absorción.

10 Tras la administración intratraqueal, la exposición a los Nanobodies de NB2 de VRS, ALX-0081, RANKL008A se observó durante al menos 24 horas en BALF (es decir, el último tiempo de muestreo para BALF).

Cantidades de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A en BALF

15 Después de la dosificación intratraqueal, se recogió el líquido de lavado broncoalveolar (BALF) en la necropsia tal como se describió anteriormente. Teóricamente, la cantidad de Nanobody en el pulmón en un punto de tiempo dado puede obtenerse multiplicando la concentración medida de cada muestra de BALF por el volumen de DPBS añadido (10 ml), siempre que el Nanobody® se limpie de manera eficiente. Estas cantidades calculadas individuales y sus valores medios (+ DE) correspondientes se enumeran en la tabla B-14 y B-15, respectivamente.

20 Tabla B-14: Cantidad teórica individual (concentración en BALF × 10 ml) de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A en BALF tras una única administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar macho.

Cantidad teórica de BALF tras la administración i.t. (µg)						
Tiempo nominal	NB2 de VRS		ALX-0081		RANKL008A	
	ID	Cantidad	ID	Cantidad	ID	Cantidad
3 min(1)	10	462	38	1446	66	323
	11	650	39	579	67	561
	12	230	40	692	68	270
	13	367	41	1155	69	802
20 min	14	328	42	404	70	144
	15	548	43	1479	71	879
	16	702	44	934	72	433
	17	681	45	557	73	224
1 h	18	1338	46	1788	74	1238
	19	507	47	806	75	703
	20	358	48	624	76	338
	21	184	49	358	77	498
2 h	22	BQL(2)	50	337	78	161
	23	221	51	369	79	583
	24	261	52	1109	80	490
	25	326	53	371	81	223
4 h	26	149	54	327	82	248
	27	609	55	24,4	83	114
	28	450	56	851	84	950
	29	48,1	57	505	85	249
6/8 h(3)	30	244	58	362	86	156
	31	436	59	901	87	421
	32	216	60	519	88	724
	33	331	61	746	89	302
24 h	34	95,3	62	209	90	327
	35	191	63	132	91	146
	36	107	64	165	92	74,8
	37	170	65	146	93	69,1

- (1) 4 min en lugar de 3 min
 (2) Por debajo del límite de cuantificación
 (3) 6 h para NB2 de VRS y ALX-0081; 8 h para RANKL008A

25 Tabla B-15: Cantidad teórica media (+/- DE; n = 4) (concentración en BALF × 10 ml) de NB2 de VRS, ALX-0081 y

RANKL008A en BALF tras una única administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar macho.

Cantidad teórica de BALF tras la administración i.t. (µg)						
Tiempo nominal	NB2 de VRS (ID 10-37)		ALX-0081 (ID 38-65)		RANKL008A (ID 66-93)	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
3 min(1)	427	176	968	404	489	244
20 min	565	172	843	479	420	329
1 h	597	511	894	624	694	392
2 h	269	53	546	375	364	204
4 h	314	261	427	346	390	379
6 h	307	99	632	239	/(2)	/
8 h	/	/	/	/	401	241
24 h	141,0	47,2	163	34	154	121

(1) 4 min en lugar de 3 min
(2) Ningún muestreo programado

5 Obsérvese, sin embargo, que se produjeron grandes variaciones en la recuperación del BALF. Para algunos animales fue posible recuperar 9,5 ml de líquido tras inyectar 10 ml de DPBS, mientras que para otros animales solo se recuperaron 3 ml. Además, puesto que el lavado se realiza dos veces y se combina en un único vial, es imposible determinar cuánto volumen se recupera del primer o segundo lavado por separado. Además, también se desconoce si hay diferencias en la concentración del primer y segundo lavado. El resultado es que pueden producirse sobreestimaciones de la verdadera cantidad de Nanobody cuando las concentraciones medidas en BALF se multiplican simplemente con el volumen teórico de 10 ml de DPBS. Alternativamente, si la cantidad de Nanobody se estima multiplicando la concentración medida de cada muestra de BALF por el volumen recuperado real de BALF, esto puede dar como resultado subestimaciones de la cantidad real de Nanobody en el caso de que estén presentes cantidades significativas de Nanobody en BALF no recuperado. Por tanto, la verdadera cantidad de Nanobody en BALF debe estar comprendida teóricamente entre la cantidad calculada mediante el volumen de BALF teórico y el volumen de BALF real. Es importante observar que cuanto mayor sea el volumen recuperado, se espera que los cálculos sean más precisos. Puesto que el volumen recuperado promedio es en promedio de aproximadamente 7 ml (tabla B-16), ambos métodos de cálculo no deberían proporcionar resultados muy diferentes. Las cantidades calculadas individuales y valores medios (+DE) basados en los volúmenes reales recuperados se enumeran en la tabla B-17 y B-18, respectivamente.

Tabla B-16: Volumen recuperado individual de BALF tras dos lavados con DPBS (2 × 5 ml) tras una única administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar macho.

Volumen recuperado de BALF después de los lavados						
Tiempo nominal	NB2 de VRS		ALX-0081		RANKL008A	
	ID	BALF (ml)	ID	BALF (ml)	ID	BALF (ml)
3 min(1)	10	5,5	38	7,5	66	8,0
	11	6,5	39	6,5	67	8,0
	12	8,5	40	8,5	68	4,0
	13	7,5	41	7,5	69	8,5
20 min	14	8,0	42	7,0	70	7,5
	15	6,0	43	8,0	71	3,0
	16	6,5	44	8,0	72	6,0
	17	8,5	45	7,5	73	8,0
1 h	18	6,5	46	8,0	74	7,0
	19	6,5	47	7,5	75	6,0
	20	7,5	48	8,0	76	7,5
	21	7,5	49	7,0	77	8,0
2 h	22	5,5	50	8,0	78	6,0

ES 2 701 649 T3

	23	6,0	51	8,0	79	7,5
	24	6,5	52	6,5	80	8,0
	25	7,0	53	7,5	81	8,0
4 h	26	5,5	54	8,0	82	7,0
	27	5,0	55	8,0	83	6,5
	28	9,5	56	9,0	84	7,0
	29	8,0	57	7,5	85	7,5
6/8 h(2)	30	7,0	58	8,0	86	7,0
	31	7,0	59	9,0	87	6,5
	32	7,0	60	6,0	88	7,5
	33	8,5	61	8,5	89	9,0
24 h	34	6,5	62	7,5	90	8,0
	35	6,5	63	7,5	91	7,5
	36	7,5	64	8,5	92	8,0
	37	7,0	65	6,5	93	5,5
(1) 4 min en lugar de 3 min						
(2) 6 h para NB2 de VRS y ALX-0081; 8 h para RANKL008A						

Tabla B-17: Cantidad real individual (concentración en BALF × volumen recuperado) de NB2 de VRS, ALX-0081, y RANKL008A en BALF tras una única administración intratraqueal de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas macho.

5

Cantidad real de BALF tras la administración i.t. (µg)						
Tiempo nominal	NB2 de VRS		ALX-0081		RANKL008A	
	ID	Cantidad	ID	Cantidad	ID	Cantidad
3 min(1)	10	254	38	1084	66	258
	11	422	39	377	67	449
	12	195	40	588	68	108
	13	275	41	866	69	682
20 min	14	262	42	283	70	108
	15	329	43	1183	71	264
	16	456	44	747	72	260
	17	579	45	418	73	179
1 h	18	869	46	1430	74	867
	19	330	47	605	75	422
	20	269	48	499	76	254
	21	138	49	250	77	399
2 h	22	BDL	50	270	78	96,4
	23	132	51	295	79	438
	24	170	52	721	80	392
	25	228	53	278	81	179
4 h	26	81,9	54	262	82	174
	27	305	55	19,5	83	74,3
	28	428	56	766	84	665
	29	38,5	57	379	85	187
6/8 h(2)	30	171	58	289	86	109
	31	305	59	811	87	274
	32	151	60	311	88	543
	33	281	61	634	89	272

ES 2 701 649 T3

24 h	34	62,0	62	157	90	262
	35	124	63	98,7	91	110
	36	80,0	64	140	92	59,9
	37	119	65	95,2	93	38,0
(1) 4 min en lugar de 3 min (2) 6 h para NB2 de VRS y ALX-0081; 8 h para RANKL008A						

Tabla B-18: Cantidad real media (concentración en BALF × volumen recuperado) de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A en BALF tras una única administración intratraqueal NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas macho.

5

Cantidad real de BALF tras la administración i.t. (µg)						
Tiempo nominal	NB2 de VRS (ID 10-37)		ALX-0081 (ID 38-65)		RANKL008A (ID 66-93)	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
3 min(1)	287	97	729	310	374	248
20 min	406	140	658	401	203	74
1 h	401	322	696	512	485	265
2 h	177	48	391	220	276	165
4 h	213	185	357	311	275	265
6 h	227	77	512	254	/(2)	/
8 h	/	/	/	/	299	180
24 h	96,5	30,4	123	30	117	101
(1) 4 min en lugar de 3 min (2) Ningún muestreo programado por protocolo						

Al dividir la cantidad calculada de Nanobody® entre la cantidad real administrada (NB2 de VRS: 1,14 mg, ALX-0081: 0,985 mg, RANKL008A: 1,03 mg), se calculó la fracción recuperada de la dosis (expresada como %). En las tablas B-19 a B-22 se enumeran cantidades individuales y sus valores medios correspondientes (+DE), expresados como % de la dosis administrada, y basándose en el volumen de BALF teórico (10 ml) y volúmenes reales recuperados.

10

Tabla B-19: Cantidad teórica individual (concentración en BALF × 10 ml) expresada como % de la dosis de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A en BALF tras una única administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar macho.

15

Cantidad teórica de BALF expresada como % de la dosis						
Tiempo nominal	NB2 de VRS		ALX-0081		RANKL008A	
	ID	Cantidad/D (%)	ID	Cantidad/D (%)	ID	Cantidad/D (%)
3 min(1)	10	40,5	38	147	66	31,3
	11	57,0	39	58,8	67	54,4
	12	20,2	40	70,2	68	26,2
	13	32,2	41	117	69	77,8
20 min	14	28,7	42	41,0	70	14,0
	15	48,1	43	150	71	85,4
	16	61,6	44	94,8	72	42,0
	17	59,7	45	56,5	73	21,8
1 h	18	117,3	46	182	74	120
	19	44,5	47	81,8	75	68,3
	20	31,4	48	63,3	76	32,8
	21	16,2	49	36,3	77	48,4
2 h	22	BQL(2)	50	34,3	78	15,6
	23	19,3	51	37,5	79	56,6

ES 2 701 649 T3

	24	22,9	52	113	80	47,6
	25	28,6	53	37,6	81	21,7
4 h	26	13,1	54	33,2	82	24,1
	27	53,4	55	2,48	83	11,1
	28	39,5	56	86,4	84	92,3
	29	4,22	57	51,3	85	24,2
6/8 h(3)	30	21,4	58	36,7	86	15,1
	31	38,3	59	91,5	87	40,9
	32	18,9	60	52,7	88	70,3
	33	29,0	61	75,8	89	29,3
24 h	34	8,36	62	21,2	90	31,8
	35	16,8	63	13,4	91	14,2
	36	9,36	64	16,7	92	7,26
	37	15,0	65	14,9	93	6,71
(1) 4 min en lugar de 3 min (2) Por debajo del límite de cuantificación (3) 6 h para NB2 de VRS y ALX-0081; 8 h para RANKL008A						

Tabla B-20: Cantidad real individual (concentración en BALF × volumen recuperado) normalizada por la dosis (%) de NB2 de VRS, ALX-0081 y RANKL008A en BALF tras la administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar macho.

5

Cantidad real de BALF expresada como % de la dosis						
Tiempo	NB2 de VRS		ALX-0081		RANKL008A	
	ID	Cantidad/D (%)	ID	Cantidad/D (%)	ID	Cantidad/D (%)
3 min(1)	10	22,3	38	110	66	25,1
	11	37,0	39	38,2	67	43,6
	12	17,1	40	59,7	68	10,5
	13	24,1	41	87,9	69	66,2
20 min	14	23,0	42	28,7	70	10,5
	15	28,8	43	120	71	25,6
	16	40,0	44	75,8	72	25,2
	17	50,8	45	42,4	73	17,4
1 h	18	76,3	46	145	74	84,1
	19	28,9	47	61,4	75	41,0
	20	23,6	48	50,6	76	24,6
	21	12,1	49	25,4	77	38,7
2 h	22	BQL(2)	50	27,4	78	9,4
	23	11,6	51	30,0	79	42,5
	24	14,9	52	73,2	80	38,1
	25	20,0	53	28,2	81	17,3
4 h	26	7,19	54	26,6	82	16,9
	27	26,7	55	1,98	83	7,21
	28	37,5	56	77,8	84	64,6
	29	3,37	57	38,5	85	18,1
6/8 h(3)	30	15,0	58	29,4	86	10,6
	31	26,8	59	82,3	87	26,6
	32	13,2	60	31,6	88	52,7
	33	24,6	61	64,4	89	26,4
24 h	34	5,44	62	15,9	90	25,4

ES 2 701 649 T3

	35	10,9	63	10,0	91	10,6
	36	7,02	64	14,2	92	5,81
	37	10,5	65	9,66	93	3,69
(1) 4 min en lugar de 3 min (2) Por debajo del límite de cuantificación (3) 6 h para NB2 de VRS y ALX-0081; 8 h para RANKL008A						

Tabla B-21: Cantidad teórica media (+DE: $n = 4$) (concentración en BALF \times 10 ml) normalizada por la dosis (%) de NB2 de VRS, ALX-0081, y RANKL008A en BALF tras la administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar macho.

5

Cantidad teórica de BALF expresada como % de la dosis						
Tiempo	NB2 de VRS (ID 10-37)		ALX-0081 (ID 38-65)		RANKL008A (ID 66-93)	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
4 min	37,5	15,5	98,3	41,0	47,5	23,7
20 min	49,5	15,1	85,6	48,6	40,8	32,0
1 h	52,3	44,8	90,7	63,3	67,4	38,0
2 h	23,6	4,7	55,5	38,1	35,4	19,8
4 h	27,6	22,9	43,4	35,1	37,9	36,8
6 h	26,9	8,7	64,2	24,3	/(2)	/
8 h	/	/	/	/	38,9	23,4
24 h	12,4	4,1	16,5	3,4	15,0	11,7
(1) 4 min en lugar de 3 min (2) Ningún muestreo programado por protocolo						

Tabla B-22: Cantidad real media (concentración en BALF \times volumen recuperado) normalizada por la dosis (%) de NB2 de VRS, ALX-0081, y RANKL008A en BALF tras la administración i.t. de NB2 de VRS (3,6 mg/kg), ALX-0081 (3,1 mg/kg) y RANKL008A (3,2 mg/kg) a ratas Wistar macho.

10

Cantidad real de BALF expresada como % de la dosis						
Tiempo	NB2 de VRS (ID 10-37)		ALX-0081 (ID 38-65)		RANKL008A (ID 66-93)	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
3 min(1)	25,1	8,5	74,0	31,5	36,3	24,1
20 min	35,7	12,3	66,8	40,7	19,7	7,2
1 h	35,2	28,2	70,7	51,9	47,1	25,7
2 h	15,5	4,2	39,7	22,3	26,8	16,0
4 h	18,7	16,2	36,2	31,6	26,7	25,7
6 h	19,9	6,8	51,9	25,8	/(2)	/
8 h	/	/	/	/	29,1	17,5
24 h	8,46	2,66	12,5	3,1	11,4	9,8
(1) 4 min en lugar de 3 min (2) Ningún muestreo programado por protocolo						

Al dividir la cantidad calculada de Nanobody entre la cantidad real administrada, la fracción recuperada de la dosis podría compararse a lo largo del tiempo: la cantidad media más alta con respecto a porcentajes de las dosis por medio de volumen real y teórico son el 35,7 % y el 49,5 % para NB2 de VRS (tras 20 minutos), el 74,0 % y el 98,3 % para ALX-0081 (tras 4 minutos) y el 47,1 % y el 67,4 % para RANKL008A (tras 1 hora), respectivamente. Por tanto, para ALX-0081 casi la fracción total de la dosis podría recuperarse en el BALF, mientras que para NB2 de VRS y RANKL008A, la fracción fue menor: aproximadamente el 50 % de la cantidad individual más alta con respecto a porcentajes de dosis por medio del volumen real y teórico son el 76,6 % y el 117,3 % para NB2 de VRS, el 145 % y el 182 % para ALX-0081 y el 84,1 % y el 120 % para RANKL008A a un punto de tiempo de 1 hora tras la dosis. Tal como se esperaba, la variabilidad era apreciable.

15

20

Tras 24 horas, la fracción de la dosis recuperada en BALF fue menor para todos los Nanobodies que en puntos de tiempo anteriores. La fracción media recuperada osciló entre el 12,4 % y el 16,5 % por medio del volumen teórico y osciló entre el 8,46 % y el 12,5 % por medio de los volúmenes reales para los tres Nanobodies sometidos a prueba.

5 1.3 Conclusiones

- Tras la administración i.v. a ratas, se observaron características PK similares para NB2 de VRS y ALX-0081. Para RANKL008A, se observaron valores de aclaramiento sustancialmente menores y semividas terminales mayores. Esto puede explicarse mediante la unión del Nanobody anti-HSA de RANKL008A a albúmina de rata.

10 - Los datos actuales muestran que la exposición sistémica a Nanobodies puede lograrse tras la administración intratraqueal, lo que indica que la vía pulmonar puede ser viable como método no invasivo para la administración de Nanobodies. Los datos también indican que la biodisponibilidad sistémica parece disminuir con peso molecular creciente.

15 - Tras la administración i.t. se observaron semividas en plasma terminales comparables para los tres Nanobodies. Para NB2 de VRS y ALX-0081 las semividas en plasma son mayores tras la administración i.t. que tras la i.v., lo que indica que es limitante de la velocidad (el fármaco se absorbe lentamente desde su sitio de dosificación (es decir, el pulmón) hasta la circulación sistémica). Se observaron semividas terminales comparables tanto en plasma como en BALF, lo que apoya la noción de que la cinética puede controlarse por la tasa de absorción.

20 - Tras la administración intratraqueal, se observó la exposición de Nanobody de NB2 de VRS, ALX-0081, RANKL008A en BALF durante al menos 24 horas (es decir, el último tiempo de muestreo para BALF).

25 - Tras la administración intratraqueal, se observó exposición sistémica al Nanobody de NB2 de VRS, ALX-0081 en plasma durante al menos 24 horas (es decir, el último tiempo de muestreo de plasma tras la administración intratraqueal. Tras la administración i.v., ninguno de estos Nanobodies sin anti-HSA fue detectable a las 24 horas en plasma.

30 La figura 6 y la figura 7 ilustran además estos resultados experimentales.

Ejemplo 2.1: La administración intranasal de Nanobody bivalente RSV101 protege contra la infección y replicación de la cepa A2 del virus respiratorio sincicial (VRS) en ratones

35 Compuestos:

Nombre	Nombres alternativos	SEQ ID NO:	Referencia	Secuencia de aminoácidos
RSV101	NB2-15GS-NB2	4	un constructo bivalente en el que dos unidades de NB2 (191D3) se unen mediante un ligador 15GS. Este Nanobody se une a la proteína F de VRS y neutraliza potentemente VRS <i>in vitro</i> tal como se evalúa mediante el ensayo de microneutralización, véase, ejemplo 4.3 (CI ₅₀ de 191D3 para la cepa larga de VRS es de aproximadamente 250 nM; CI ₅₀ de RSV101 para la cepa larga de VRS es de aproximadamente 0,1 nM).	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC EASGRTYSRYGMGWFRQAPGK EREFVAAVSRLSGPRTVYADSVK GRFTISRDN AENTVY LQMNSLKP

				EDTAVYTCAAELTNRNSGAYYYA WAYDYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQAGGSLRLSCEASGRYTSRYG MGWFRQAPGKEREFVAAVSRLS GPRTVYADSVKGRFTISRDNEN TVYLMNSLKPEDTAVYTCAAEL TNRNSGAYYYAWAYDYWGQGT QVTVSSAAAEQKLISEEDLNAA HHHHHH
12D2biv			Constructo de Nanobody de control bivalente	No disponible
Palivizu mab	Synagis		Producto MedImmune; Synagis está indicado para la prevención de enfermedades de las vías respiratorias bajas graves provocadas por VRS en niños con un elevado riesgo de enfermedad por VRS (aprobado por la FDA de EE. UU.). Por ejemplo, American Academy of Pediatrics. "Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases, 27. ^a ed. "págs. 562-565	

Para someter a prueba la capacidad del Nanobody RSV101 para neutralizar virus *in vivo*, se usó un modelo de ratón. En este modelo, se inocularon ratones hembra Balb/c (9-10 semanas de edad) por vía intranasal con 100 ug de RSV101 purificado disuelto en 50 ul de PBS. Como control de Nanobody irrelevante, se usó el Nanobody bivalente 12D2biv. Además, un grupo de ratones recibió 100 ug de Palivizumab (Synagis) y un cuarto grupo recibió PBS solo. Cinco horas después, se administraron 10⁶ unidades infecciosas de la cepa A2 de VRS por vía intranasal. Cuatro días y 1 día antes de la infección con el virus y 1 y 4 días después de la infección, los ratones se trataron con ciclofosfamida (primera dosificación a 3 mg/kg; posterior dosificación a 2 mg/kg todas administradas s.c.) para suprimir el sistema inmunitario y como tal, aumentar la replicación del virus.

Tres y 5 días después de la exposición vírica, se mataron los ratones; se retiraron los pulmones, se homogeneizaron y se aclararon del tejido mediante centrifugación. Se infectaron células Hep-2 subconfluentes, incubadas en medio libre de suero, con diluciones en serie de homogeneizados de pulmón aclarados. Cuatro horas tras la infección, se retiró el medio y se reemplazó por medio nuevo que contiene FCS al 1 % y agarosa al 0,5 %. De dos a tres días tras la infección, se retiró la superposición de agarosa para permitir la tinción de placas de VRS mediante un anticuerpo anti-VRS.

Se recuperó virus infeccioso (pfu/pulmón) de todos los animales en los grupos de control negativo (PBS y 12D2biv) en homogeneizados de pulmón en el día 3 (figura 8, panel izquierdo) y 5 tras la exposición (figura 8, panel intermedio). En la figura 8, en el panel derecho se representa la media de títulos de virus infecciosos (pfu/pulmón). Ninguno de los animales en el grupo tratado con RSV101 y Synagis tuvo virus infeccioso detectable en el día 3 y 5 tras la exposición.

Ejemplo 2.2: Tras la administración intranasal el Nanobody RSV101 permanece funcionalmente activo en los pulmones durante al menos 72 horas

Con el fin de someter a prueba si los anticuerpos de nanobodies o palivizumab podrían estar todavía presentes en los pulmones 3 y 5 días tras la inoculación, se preincubaron homogeneizados de pulmón de ratones tratados con PBS durante 1 h con el mismo volumen de homogeneizados de pulmón de los diferentes grupos experimentales, preparados o bien tres o bien cinco días tras la infección.

Tal como se muestra en la figura 9 (panel izquierdo), la incubación de homogeneizados de pulmón de ratones tratados con PBS con homogeneizados de pulmón preparados tres días tras la infección de o bien RSV101 o bien palivizumab pero no ratones tratados con 12D1biv neutralizaron el virus presente en los homogeneizados de pulmón de ratones tratados con PBS. En cambio, ninguno de los homogeneizados de pulmón de ratones tratados con

RSV101 o Synagis preparados cinco días tras la infección pueden neutralizar mucho el virus presente en los homogeneizados de pulmón de ratones tratados con PBS (figura 9, panel derecho). Tomados en conjunto, estos datos muestran que el Nanobody bivalente funcional RSV101 permanece presente en los pulmones durante al menos 72 horas tras la administración.

5 Ejemplo 2.3: No se detecta ARN viral en los pulmones de ratones pretratados por vía intranasal con RSV101.

Los resultados descritos en el ejemplo 2.1 demostraron que no estaba presente ningún virus infeccioso en los pulmones de ratones tratados con RSV101. Sin embargo, todavía existía la posibilidad de que el virus haya infectado células y que el ARN genómico viral se replicara con la liberación de partículas virales no infecciosas o sin liberación de partículas virales. Para investigar esta posibilidad, la presencia de ARN viral se determinó mediante qPCR. Se aisló ARN de 100 µl de cada homogeneizado largo (1000 µl preparados 5 días tras la infección. Mediante el uso de un cebador específico de gen M, se sintetizó ADNc específico de ARN genómico de VRS y se cuantificó mediante qPCR (por duplicado). Se calculó el nivel de ARN genómico viral en cada homogeneizado de pulmón en relación con una muestra de pulmón que mostró la señal de qRT-PCR más baja (normalizada al valor de 1). Tal como se muestra en la tabla B-23, la presencia de ARN genómico viral relativo en pulmones de ratones tratados con RSV101 y Synagis® se redujo fuertemente en comparación con ratones tratados con PBS o 12D2biv.

Ratón	PBS	RSV101	12D2biv	Synagis
1	170,69	16,96	214,74	4,82
2	53,45	10,96	466,40	4,81
3	471,42	3,84	350,39	7,20
4	404,66	5,60	418,76	6,32
5	342,39	2,19	193,26	4,15
Media	288,52	7,91	328,71	5,46
DE	172,47	6,04	121,32	1,25

20 Ejemplo 3: Estudios de administración pulmonar con Nanobodies contra virus pseudotipados de HA

La siguiente descripción de la construcción de virus pseudotipados de HA y ensayos realizados tomados de (1). A sensitive retroviral pseudotype assay for influenza H5N1-neutralizing antibodies. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1(3), 105-112

25 Bibliografía:

(1). Temperton NJ, Hoschler K, Major Def *et al.* A sensitive retroviral pseudotype assay for influenza H5N1-neutralizing antibodies. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2007 1(3), 105-112.

30 (17) Besnier C, Takeuchi Y, Towers G. Restriction of lentivirus in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 9:11920-11925.

35 (19) Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B *et al.* Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 2004; 78:2994-3002.

(20) Naldini L, Blomer U, Gallay P *et al.* *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272:263-267.

40 Ejemplo 3.1: El ensayo de neutralización pseudotipado de HA

Nombre	Nombres alternativos	SEQ ID NO:	Referencia	Secuencia de aminoácidos
--------	----------------------	------------	------------	--------------------------

202-A5		6	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGDLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMTWVRQ APGKGLEWVSSINNIGEEAYY VDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLKSEDTAVYYCVKDW ASDYAGYSPNSQGTQVTVSS
202-A10		7	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQAGDSLRL SCIDSGRTFSDYPIGWFRQA PGKEREVFAAIYAIGGDVYYA DSVKGRFTISRDNANTVYL QMSSLKPEDTAIYSCAVASG GGSIRSARRYDYWGRGTQV TVSS
202-A12		8	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQAGGSLRL SCAASGGTFSSYAMGWFRQ APGKERDFVSAITWSSGGSTY YADSVKGRFTISRDNANTV YLQMNSLKPEDTAVYYCAAD DQKYDYIAYAIEYDYWGQG TQVTVSS
202-B7		9	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGDEVY YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTRDW FDDPNKNEYKGQGTQVTVSS

ES 2 701 649 T3

202-B10		10	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGDEVY YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTRDW YNDPNKNEYKGQGTQVTVS S
202-C1		11	Documento provisional US 61/139.130	KVQLVESGGDLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMTWVRQ APGKGLEWVSSINNIGEEAYY VDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLKSEDTAVYYCVKDW ASDYAGYSPNSQGTQVTVSS
202-C2		12	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGDLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMTWVRQ APGKGLEWVSSINNIGEEAYY VDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLKSEDTAVYYCVKDW ASDYAGYSPNSQGTQVTVSS
202-C8		13	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTGSGFTFSSYWMDWVRQ TPGKDLEYVSGISPSGSNTD YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKPEDTALYYCRRSL TLTDSPDLRSQGTQVTVSS
202-C9		14	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGGETY YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKSEDTAVYYCARD WYNDPNKNEYKGQGTQVTV SS

202-D5		15	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQAGGSLRL SCAASGSTGSSTAMGWSRQ APGKQREWVASISSAGTIRY VDSVKGRFTISRDNANTGY LQMNSLKPEDTAVYYCYVVG NFTTYWGRGTQVTVSS
202-D8		16	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGDEVY YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTRDW YNDPNKNEYKGQGTQVTVS S
202-E4		17	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQAGGSLRL SCAASVSAFSEYAMGWYRQ APGKQREFVATINSLGGTSY ADSVKGRFTISRDNANTVYL QMNSLKPEDTAVYYCTLYRA NLWGQGTQVTVSS
202-E5		18	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGDLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMTWVRQ APGKGLEWVSSINNIGEETYY VDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLKSEDTAVYYCVKDW ASDYAGYSPNSQGTQVTVSS
202-E6		19	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQAGGSLRL SCAASGRTFSSYAMGWFRQ APGKEREVAAISWSGRTTY YADFVKGRFTISRDNANTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAADL SPGNEYGEMMEYEYDYWGE GTQVTVSS

ES 2 701 649 T3

202-E7		20	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGGETY YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKSEDTAAYYCARD WYNDPNKNEYKGQGTQVTV SS
202-E11		21	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGDEVY YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTRDW YNDPNKNEYKGQGTQVTVS S
202-F3		22	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGDLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMTWVRQ APGKGLEWVSSINNIGEEAYY VDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLKSEDTAVYYCVKDW ASDYAGYSPNSQGTQVTVSS
202-F4		23	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGDLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMTWVRQ APGKGLEWVSSINNIGEEAYY VDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLKSEDTAVYYCVKDW ASDYAGYSPNSQGTQVTVSS
202-F8		24	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGLIFSSYDMGWFRQA PGEERAFVGAISRSGDVRYV DPVKGRFTITRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAADADG WWHRGQAYHWWGQGTQVT VSS

ES 2 701 649 T3

202-G3		25	Documento provisional US 61/139.130	EVQLMESGGGLVQAGGSLR LSCAASGRTFSGYTMGWFR QAPGKGREWVAGISWSGDS TYYADSVKGRFTISREDAKNT VYLQMNSLKP GDTADYYCAA ECAMYGSSWPPPCMDWGQ GTQVTVSS
202-G8		26	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGSVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNLGGDTY YADSVKGRFTISRDNAMML YLQMNSLKAEDTAVYYCARD WYDDPNKNEYKGQGTQVTV SS
202-G11		27	Documento provisional US 61/139.130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGGETY YADSVKGRFTISRDNAMNTLY LQMNSLKSEDTAAYYCARD
203-B1		28		EVQLVESGGDLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMTWVRQ APGKGLEWVSSINNVGEETY YVDSVKGRFTISRDNAMNTLY LQMNSLKSEDTAVYYCVKDW ESSYAGYSPNSQGTQVTVSS

ES 2 701 649 T3

203-H1		29		EVQLVESGGGVVQAGGSLRL SCAASGLTFDIYSMGWFRQQ PGKEREVVASIGRSGNSTNY ASSVKDRFTISRDNAAKLVYL EMNSLTVEDAAVYVCAAKDG PLITHYSTTSMYWGQGTQVT VSS
203-E12		30		EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRGYWMSWVRQ APGKGLEWVSAINNVGDEVY YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTRDW YNDPNKNEYKGQGTQVTVS S
203-H9		31		EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTGSGFTFSSYWMDWVRQ TPGKDLEYVSGISPSGGNTD YADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNSLQPEDTALYYCRRSL TLTDSPDLRSQGTQVTVSS
203-B12		32		EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMGWVRR APGEGLEWVSSISSGGALPT YADSVKGRFTISRDNVKNTLY LQMNSLKPEDTAVYSCEKYA GSMWTSERDAWGQGTQVT VSS

203-A9		33		EVQLVESGGGLVQAGDSLRL SCIDSGRTFSYPIGWFRQA PGKEREVFAAIYPTDDNPTG PNAYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMQSSSLKPEDTAIYSC AVASGGGSIISARRYDYWGQ GTQVTVSS
203-D9		34		EVQLVESGGGWVQAGDSLRL LSCAASGRTLSSYAMAWFRQ APGKERDFVTGITWNGGSTY YADSVKGRFTISRDNKNTV YLMNSLKPEDTAVYYCAAB QNTYGYMDRSDYEYDYWGQ GTQVTVSS
189-E2		35		KVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGSIFSINAMGWYRQA PGKQRELVAHIASSTIYA DSVKGRFTISRDNKNTVYLM QNSLKPEDTAVYYCNTRGP AAHEVRDYWGQGTQVTVSS
191-D3		41		EVQLVESGGGLVQAGGSLRL SCEASGRTYSRYGMGWFRQ APGKEREVFAAVSRLSGPRT VYADSVKGRFTISRDNKNTV YLMNSLKPEDTAVYTCAA ELTNRNSGAYYYAWAYDYW GQGTQVTVSS

Plásmidos y líneas celulares.

5 Se construyó el plásmido pl.18/VN1194 HA en NIBSC (R.U.). Se amplificó el ORF de HA de longitud completa de A/Vietnam/1194/04 mediante PCR y se clonó en el vector de expresión pl.18. Este plásmido de estructura principal es un plásmido a base de pUC que incorpora elementos de promotor e intrón A de citomegalovirus humano. Los constructos de gag/pol de VLM y VIH se han descrito previamente. El constructo notificador de luciferasa (Luc) VLM-Luc se ha descrito (19). Se ha descrito anteriormente la proteína de envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) pMDG (20). Se cultivaron todas las líneas celulares en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) con
10 Glutamax y alto contenido en glucosa (Gibco, Paisley, Escocia, R.U.), complementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina/estreptomina, excepto para las células 293T (suero bovino fetal al 15 %).

Producción de vector viral e infección de células diana

Se dividieron placas confluentes de células de 293T 1:4 el día anterior a la transfección. Se transfectó cada placa de células 293T con 1 g de constructo gag/pol, 1,5 ug de constructo notificador Luc y 1,5 ug de constructo que expresa HA o VSV-G usando el reactivo de transfección Fugene-6. A las 24 h tras la transfección, se añadió 1 U de neuraminidasa exógena (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) para inducir la liberación de partículas pseudotipadas de HA de la superficie de las células productoras. Se recogió el sobrenadante 48 y 72 h tras la transfección, se filtró a través de filtros de 0,45- μ m, y se almacenó a -80 °C. Se midieron los títulos del vector de VLM en células 293T humanas, QT6 de codorniz, MDCK caninas, PK15 porcinas y ST-IOWA y se presentan como unidades infecciosas (UI) por mililitro. En resumen, se infectaron células con vector, y se determinaron los títulos de Luc 72 h después mediante ensayo de Luc. Se expresaron los títulos como URL para Luc.

Ensayo de neutralización de pseudotipo de VLM(HA)

Se inactivaron por calor muestras de (5 ul) a 56 °C durante 30 min, se diluyeron en serie dos veces en medio de cultivo, y se mezclaron con viriones de VLM(HA) (10 000 URL para Luc) a una razón 1:1 v/v. Se diluyeron los Nanobodies purificados (10 o 20 ul) a 100 ul y se diluyeron en serie dos veces en medio de cultivo, y se mezclaron con viriones de VLM(HA) (10 000 URL para Luc) a una razón 1:1 v/v. Tras la incubación a 37 °C durante 1 h, se añadieron 1×10^4 células 293T a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se evaluaron las unidades relativas de luz (URL) para Luc 48 h después mediante luminometría usando el sistema Bright-Glo de Promega (Promega, Madison, WI, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Se determinaron títulos de anticuerpos neutralizantes de CI_{90}/CI_{50} como la dilución sérica más alta en una reducción de infección 90/50 % (tal como se midió mediante transferencia de genes marcadores) en comparación con un control de solo virus de pseudotipo. Para Luc, los títulos <100 se designan como negativos.

Ejemplo 3.2: Las llamas desarrollan títulos altos de anticuerpos neutralizantes de virus tras inmunizaciones con HA H5 purificada.

Se sometieron a prueba sueros tomados de llamas inmunizadas antes (preinmune) y 21 y 48 días después de la primera inmunización en el ensayo de neutralización pseudotipado tal como se describe en el ejemplo 3.1. (Figura 10). El suero preinmune no mostró actividad neutralizante, mientras que estaban presentes CI_{90} de 25 600 a 51 200 en la llama 140 y 163, respectivamente.

Ejemplo 3.3: Identificación de Nanobodies que bloquean la interacción de HA con ácido siálico en fetuina (figuras 11 y 12)

La hemaglutinina (HA) en virus influenza se une a ácido siálico en las células durante la infección. El sitio de unión a ácido siálico de la HA forma un bolsillo que se conserva entre cepas de influenza. La mayoría de HA de virus influenza aviares reconocen preferentemente receptores de ácido siálico que contienen la unión $\alpha(2,3)$ a galactosa en cadenas laterales de hidratos de carbono (virus humanos, la unión $\alpha(2,6)$). Para aumentar la posibilidad de aislar Nanobodies neutralizantes, puede usarse un enfoque de selección funcional, identificar Nanobodies que compiten con ácido 2,3-siálico soluble (o ácido 2,6-siálico para algunas variantes de deriva mutacional). Esto seleccionaría Nanobodies que seleccionan como diana el sitio de unión a ácido siálico de HA. Es probable que estos Nanobodies sean los más potentes en la neutralización de H5N1.

Se han seleccionado Nanobodies que se unen a HA H5N1 y para identificar los Nanobodies que se unen al sitio de unión a ácido siálico se realizaron los siguientes experimentos. Se recubrió con fetuina (de suero de ternero fetal, F2379, Sigma-Aldrich) (10 μ g/ml) una placa de 96 pocillos y se incubó durante la noche a 4 °C. Se bloqueó la placa en BSA al 2 % y luego se añadieron HA biotinilada 0,7 μ g/ml (HA-bio) y 10 μ l de fracciones periplásmicas o nanobodies purificados para la competición. Tras la incubación durante 1 hora, se añadió estreptavidina conjugada con HRP y se incubó durante 1 hora. Se determinó la especificidad de unión de HA-bio no reconocida por fracciones periplásmicas o nanobodies purificados basándose en los valores de DO en comparación con controles que no han recibido Nanobody. Los resultados de la competición entre fracciones periplásmicas o nanobodies purificados y fetuina por la unión a HA-bio se muestran en las figuras 11, 12 y 13. Varios clones de Nanobody mostraron competición, lo que puede indicar que los Nanobodies que compiten reconocen el sitio de unión a ácido siálico en la HA.

Ejemplo 3.4: Identificación de los Nanobodies 202-C8, 203-B12 y 203-H9 que neutralizan virus pseudotipado con HA (figuras 13 y 14)

Se sometieron a prueba varios nanobodies purificados en el ensayo de neutralización de virus pseudotipado descrito en el ejemplo 3.1. En la figura 14, se muestra la neutralización de una única dilución de 10 veces de diferentes Nanobodies y solo el Nanobody 202-C8 redujo fuertemente la actividad luciferasa, indicativa de una actividad neutralizante de virus de este Nanobody. La identificación de dos más Nanobodies neutralizantes de virus 203-B12 y 203-H9 se representa en la figura 15.

Ejemplo 3.5: Las combinaciones de Nanobodies 202-C8, 203-B12 y 203-H9 no dan como resultado una neutralización aumentada.

5 El tratamiento combinado con diferentes anticuerpos neutralizantes de virus podría dar como resultado un efecto neutralizante aditivo o incluso sinérgico. Sin embargo, esto no se observó cuando se sometieron a prueba combinaciones de 202-C8 con 203-B12 o 202-C8 con 203-H9 o 203-B12 con 203-H9 en el ensayo de neutralización pseudotipado (figura 16).

Ejemplo 3.6: Neutralización *in vivo* de virus influenza mediante el Nanobody 202-C8

10 Para someter a prueba la capacidad del Nanobody 202-C8 para neutralizar virus *in vivo*, se usó un modelo de ratón. En este modelo, se les inoculó por vía intranasal a ratones Balb/c hembra (6-7 semanas de edad) 100 ug de 202-C8 purificado disuelto en 50 ul de PBS. Como control de Nanobody irrelevante, se usó el Nanobody de VRS 191-D3. Además, un grupo de ratones recibió PBS solo. Cuatro horas después, se administró por vía intranasal 1 DL50 del NIBRG-14 adaptado a ratón. El virus NIBRG-14 contiene la HA (con el sitio de escisión polibásico eliminado) y la NA del virus A/Vietnam/1194//2004 (H5N1). Los genes virales internos son del A/Puerto Rico/8/1934(H1N1).

15 Cuatro y seis días después de la exposición viral, se sacrificaron los ratones, se extirparon los pulmones y se homogeneizaron. Se determinaron los títulos virales (TCID50) mediante infección de células MDCK con diluciones en serie de homogenados de pulmón. Se determinó la presencia de virus en el sobrenadante celular mediante ensayos de hemaglutinación. Se calcularon los títulos según el método de Muench y Reed. Se introdujo un valor de "0" si no se detectó virus. La media geométrica y la desviación estándar se notifican para cada grupo a cada punto de tiempo.

20 Los ratones tratados con 202-C8 nunca mostraron ningún signo de enfermedad durante el experimento completo. Los ratones tratados con PBS y 191D3 mostraron signos clínicos, incluyendo pelaje erizado, inactividad, postura encorvada y depresión.

25 Se registró el virus de todos los animales en los grupos de control negativo (PBS y 191-D3) en homogenados de pulmón el día 4 y 6 tras la exposición. Ninguno de los animales en el grupo tratado con 202-C8 tenía títulos de virus detectables el día 4 y 6 tras la exposición (tabla B-24).

Tabla B-24: Títulos virales en ratón 4 y 6 días tras la inoculación

Día 4 Títulos de pulmón (TCID50/ml de homogenado de pulmón)					
Grupo	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Media geo.	Desv. est.
PBS (n = 3)	355656	63246	63246	160716	137843
191D3 (n = 3)	112468	112468	632456	285797	245124
202-C8 (n = 3)	0	0	0	0	0
Día 6 Títulos de pulmón (TCID50/ml de homogenado de pulmón)					
Grupo	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Media geo.	Desv. est.
PBS (n = 3)	63426	112468	112468	96121	23119
191-D3 (n = 3)	63246	112468	112468	96061	23203
202-C8 (n = 3)	0	0	0	0	0

35 Ejemplo 3.7: Tras la administración intranasal el Nanobody 202-C8 sigue siendo funcionalmente activo en los pulmones durante al menos 48 horas

40 Para someter a prueba cuánto tiempo permanece activo el Nanobody 202-C8 en los pulmones tras la inoculación intranasal, se les inoculo a ratones Balb/c hembra (6-7 semanas de edad) 100 ug de 202-C8 purificado disuelto en 50 ul de PBS. Como control de Nanobody irrelevante, se usó el Nanobody de VRS 191-D3. Además, un grupo de ratones recibió PBS solo. Todos los ratones recibieron 1 DL50 del NIBRG-14 adaptado a ratón por vía intranasal, pero se les administró el virus 4, 24 o 48 horas tras la inoculación de los Nanobodies. Cuatro días tras la exposición viral, se sacrificaron los ratones, se extirparon los pulmones y se homogeneizaron. Se determinaron los títulos virales (TCID50) mediante infección de células MDCK con diluciones en serie de homogenados de pulmón. Se determinó la presencia de virus en el sobrenadante celular mediante ensayos de hemaglutinación. Se calcularon los títulos según el método de Muench y Reed. Se introdujo un valor de "0" si no se detectó virus. Se notifican la media geométrica y la desviación estándar para cada grupo en cada punto de tiempo (tabla B-25).

50 Los ratones pretratados con 202-C8 nunca mostraron ningún signo de enfermedad durante el experimento completo. Los ratones tratados con PBS y 191D3 mostraron signos clínicos, incluyendo pelaje erizado, inactividad, postura encorvada y depresión y una reducción en el peso corporal (figura 17, panel derecho).

ES 2 701 649 T3

5 Se recuperó el virus de todos los animales pretratados con el Nanobody de control 191-D3 o PBS. No pudo detectarse virus en los pulmones de ratones que se trataron con 202-C8, 4 y 24 horas antes de la inoculación del virus. No pudo detectarse ningún virus en los pulmones de tres ratones de siete tratados con 202-C8 48 horas antes de la inoculación del virus (figura 17, panel izquierdo y tabla B-25). Los títulos virales en los 4 ratones restantes se redujeron en promedio 50 veces en comparación con los títulos virales encontrados en los pulmones de ratones tratados con 191-D3 48 horas antes de la inoculación viral.

10 Tomados conjuntamente, estos datos muestran que el Nanobody monovalente 202-C8 sigue estando presente activamente en los pulmones durante al menos 48 horas tras la administración.

Tabla B-25: Nota LBG4 = 202-C8; LBG3 = 191-D3

	Peso Día 0	Peso Día 1	Peso Día 2	Peso Día 3	Peso Día 4	Título en pulmón Día 4
LBG4 4 h ratón 1	18,15	18,32	17,67	18,5	18,23	0
LBG4 4 h ratón 2	20,67	20,42	20,43	20,94	20,93	0
LBG4 4 h ratón 3	19,72	19,67	18,97	19,68	19,77	0
Promedio	19,51	19,47	19,02	19,71	19,64	0
Desv. est.	1,27	1,06	1,38	1,22	1,35	0
LBG4 24 h ratón 1	18,76	18,81	18,52	18,83	18,85	0
LBG4 24 h ratón 2	19,48	19,62	18,99	18,96	19,13	0
LBG4 24 h ratón 3	18,73	18,55	18,18	18,34	18,32	0
LBG4 24 h ratón 4	19,19	19,27	18,9	19,48	19,32	0
LBG4 24 h ratón 5	18,95	19,24	18,36	18,96	19,06	0
LBG4 24 h ratón 6	18,99	18,81	18,21	18,66	18,91	0
Promedio	19,02	19,05	18,53	18,87	18,93	0
Desv. est.	0,28	0,39	0,35	0,38	0,34	0
LBG4 48 h ratón 1	17,88	17,5	17,44	17,43	17,81	9355
LBG4 48 h ratón 2	17,29	17,01	16,94	17,11	17,37	355656
LBG4 48 h ratón 3	19,42	19,08	19,2	19,33	19,44	93550
LBG4 48 h ratón 4	19,47	19,53	18,89	19,31	19,51	0
LBG4 48 h ratón 5	19,73	19,55	19,34	19,54	20,02	0
LBG4 48 h ratón 6	18,92	18,84	18,72	18,47	18,91	63250
LBG4 48 h ratón 7	17,94	17,65	17,82	17,74	19,49	0
Promedio	18,66	18,45	18,34	18,42	18,94	74544
Desv. est.	0,95	1,04	0,93	1,00	0,98	129378
PBS 4 h ratón 1	18,97	18,89	18,69	18,05	16,95	3556500
PBS 4 h ratón 2	18,15	18,36	18,13	17,32	15,95	6325000
PBS 4 h ratón 3	19,54	19,9	19,68	18,11	16,87	6325000
Promedio	18,89	19,05	18,83	17,83	16,59	5402167
Desv. est.	0,70	0,78	0,78	0,44	0,56	1598394
PBS 48 h ratón 1	20,01	19,73	19,59	18,76	17,66	3556500
PBS 48 h ratón 2	21,43	21,68	20,9	20,06	19,39	632500
PBS 48 h ratón 3	18,78	19,02	18,74	17,67	16,8	632500
Promedio	20,07	20,14	19,74	18,83	17,95	1607167

Desv. est.	1,33	1,38	1,09	1,20	1,32	1688172
LBG3 4 h ratón 1	20,3	20,42	20,11	19,72	19,28	6324600
LBG3 4 h ratón 2	18,39	18,54	18,66	18,38	18,33	9355000
LBG3 4 h ratón 3	18,39	18,82	18,44	17,77	16,3	3556500
Promedio	19,03	19,26	19,07	18,62	17,97	6412033
Desv. est.	1,10	1,01	0,91	1,00	1,52	2900239
LBG3 24 h ratón 1	18,94	18,63	18,62	18,21	18,29	6324600
LBG3 24 h ratón 2	19,46	19,62	19,4	18,48	18,09	63250000
LBG3 24 h ratón 3	19,63	19,58	19,83	19,18	18,51	2000000
LBG3 24 h ratón 4	19,03	18,94	19,07	18,45	17,49	6325000
LBG3 24 h ratón 5	18,91	18,72	19	17,84	17,32	935500
Promedio	19,19	19,10	19,18	18,43	17,94	15767020
Desv. est.	0,33	0,47	0,46	0,49	0,51	26657313
LBG3 48 h ratón 1	19,5	19,39	18,93	19,04	18	3556500
LBG3 48 h ratón 2	19,53	19,3	19,2	18,76	17,94	3556500
LBG3 48 h ratón 3	20,02	20,23	20,46	19,81	19,26	9355000
LBG3 48 h ratón 4	18,21	18,09	18,12	17,75	17,29	935500
LBG3 48 h ratón 5	18,38	18,17	18,32	17,92	16,53	6325000
LBG3 48 h ratón 6	21,19	20,83	20,55	20,34	18,98	632460
Promedio	19,47	19,34	19,26	18,94	18,00	4060160
Desv. est.	1,10	1,09	1,04	1,02	1,02	3322192

Ejemplo 4: Estudios adicionales con un constructo de nanobody anti-VRS

Ejemplo 4.1:- Estudio profiláctico con RSV407 en rata del algodón

5

SEQ ID NO:	Referencia	Nombre	Secuencia de aminoácidos
36	SEQ ID NO: 2415 en el documento PCT/EP2 009/056975	RSV407	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNYV LWFRQAPGKEREVAAINWRGDITIGPPNVEG RFTISRDNKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAG TPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLISCA AASGGSLSNYVWFRQAPGKEREVAAINWR GDITIGPPNVEGRFTISRDNKNTGYLQMNSLAP DDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGT QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQAGGSLISCAASGGSLSNYVWFRQAPG KEREVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNK NTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIY DWSYDYWGRGTQVTVSSAAAEQKLISEEDLNG AAHHHHHH

En este estudio se trataron ratas del algodón o bien por vía i.m. o bien por vía intranasal con constructos de Nanobody neutralizantes de VRS (VRS 407) o control (PBS). Se administra exposición a VRS viral por vía intranasal 1 hora después. El día 4, se sacrifican los animales y se determinan los títulos de VRS mediante Q-PCR en lavados nasales y de pulmón así como en tejido nasal y de pulmón.

10

RSV407 es un constructo de Nanobody trivalente que consiste en 3 elementos estructurales idénticos unidos por

espaciadores de 15GS. El elemento estructural se une a la proteína F de VRS y puede neutralizar la infección por VRS de la cadena larga con una CI_{50} de aproximadamente 50-100 nM. Mediante formateo para dar un constructo trivalente, la potencia de neutralización del constructo aumentó hasta una CI_{50} de aproximadamente 100 pM en la cadena larga de VRS.

5

Ejemplo 4.2 - Estudio terapéutico con RSV407 en rata del algodón

Se han descrito en el pasado estudios terapéuticos de VRS; por ejemplo, por Crowe y colaboradores (PNAS 1994; 91:1386-1390) y Prince y colaboradores (Journal of Virology 1987; 61:1851-1854).

10

En este estudio se infectan por vía intranasal ratas del algodón con VRS. Veinticuatro horas tras la infección se trató un primer grupo de animales con constructos de Nanobody neutralizantes de VRS (VRS 407) o control (PBS). El tratamiento se administra a tejido pulmonar mediante administración intranasal o de aerosol. El tratamiento se repite a las 48 y 72 horas. El día 4 se sacrifican los animales y se determinan los títulos de VRS mediante Q-PCR en lavado nasal y de pulmón así como en tejido nasal y de pulmón. En el segundo grupo el tratamiento se inicia solo 3 días tras la infección y se repite el día 4 y 5. Finalmente, el día 6 se sacrifican los animales y se determinan los títulos de VRS mediante Q-PCR en lavado nasal y de pulmón así como en tejido nasal y de pulmón.

15

Ejemplo 4.3 - Pulmón a sistémica con constructo de Nanobody contra VRS

20

En este estudio se expone tejido de pulmón de ratas a un Nanobody neutralizante de VRS (RSV407) mediante administración intratraqueal o de aerosol. Se toman muestras de suero y BAL a puntos de tiempo regulares hasta 3 días tras la administración. Se mide la concentración de Nanobody por medio de ELISA y se someten muestras a microneutralización de VRS (véase a continuación). Combinando la información del ELISA y el ensayo de neutralización, puede determinarse la CI_{50} de VRS de cada muestra para evaluar la biodisponibilidad sistémica del Nanobody de VRS funcional.

25

Microneutralización: Se usa el ensayo de microneutralización de VRSh para investigar la capacidad de neutralización *in vitro* de Nanobodies de VRSh purificados seleccionados. En este caso, se siembran células Hep2 a una concentración de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio DMEM que contenía suero de ternero fetal al 10 % (FCS) complementado con penicilina y estreptomycin (100 U/ml y 100 μ g/ml, respectivamente) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO_2 . Se preincuba una cantidad convencional de la cepa de VRSh Long LM-2 (n.º de registro P12568; ATCC VR-26) con diluciones en serie de muestras en un volumen total de 50 μ l durante 30 minutos a 37 °C. El medio de las células Hep2 se reemplaza con la premezcla para permitir la infección durante 2 horas, tras lo cual se añaden 0,1 ml de medio de ensayo. El ensayo se realiza en medio DMEM complementado con suero de ternero fetal al 2,5 % y penicilina y estreptomycin (100 U/ml y 100 μ g/ml, respectivamente). Se incuban las células durante 72 horas adicionales a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO_2 , tras lo cual las células se fijan con acetona fría al 80 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS (100 μ l/pocillo) durante 20 minutos a 4 °C y se dejan secar completamente. A continuación se detecta la presencia de la proteína F sobre la superficie celular en un ensayo de tipo ELISA. Para ello, se bloquean células Hep2 fijadas con disolución de albúmina sérica bovina (BSA) al 2 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se incuban durante 1 hora con suero de conejo policlonal anti-proteína F (Corral *et al.* 2007, BMC Biotech 7: 17) o Synagis® (2 μ g/ml). Para la detección anticuerpos caprinos contra las inmunoglobulinas de conejo conjugados con HRP o anticuerpos caprinos contra IgG humana, se usa anticuerpo con HRP específico para el fragmento Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), tras lo cual se revela el ELISA según procedimientos convencionales.

35

40

45

Ejemplo 5 - Pulmón a sistémica con Nanobody contra RANKL (véase el documento WO 2008/142164 para nanobodies de RANKL y constructos de los mismos)

En este estudio se expone el tejido de pulmón del primer grupo de monos cynomolgus a un constructo de Nanobody de semivida extendida contra RANKL (RANKL 008a o RANKL180 o RANKL010a) mediante administración intratraqueal o de aerosol. Se toman muestras de orina, suero y BAL a puntos de tiempo regulares hasta 3 meses tras la administración. Se mide la concentración de Nanobody por medio de ELISA para determinar la farmacocinética sistémica de este Nanobody de semivida extendida. Se evalúa el efecto farmacodinámico del Nanobody de RANKL midiendo la disminución de N-telopéptido (NTx), un biomarcador del recambio del hueso, en suero y orina. Se trata un segundo grupo de animales y se analiza exactamente del mismo modo, sin embargo en este caso se omite el elemento estructural de Nanobody de unión a HSA (RANKL13hum5-9GS-RANKL13hum5 o RANKL18-30GS-RANKL18 o RANKL18hum6-30GS-RANKL18hum6) y por tanto el Nanobody tiene una semivida extendida.

55

60

Ejemplo 6 - Eficacia terapéutica de Nanobody administrado por vía intranasal

Nombre del constructo	SEQ ID NO	SEQ ID NO de ref.	Secuencia de aminoácidos
202-C8-9GS-202-C8 o (202-c8)2	37	2423 en el documento PCT/EP20 09/056975	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSGFTFSSYW MDWVRQTPGKDLEYVSGISPSGSNTDYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCRRSLT LTDSPDLRSQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVOLVE SGGGLVQPGGSLRLSCTGSGFTFSSYWMDWVR QTPGKDLEYVSGISPSGSNTDYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCRRSLT LTDSPDLRSQGTQVTVSS
191D3-15GS-191D3 o (191-d3)2	38	2382 en el documento PCT/EP20 09/056975	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTYSRYGMGWFRQAPGK EREFVAAVSRLSGPRTVYADSVKGRFTISRDN AENTVYLQMNSLKPEDTAVYTCAAEL TNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGG GGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC EASGRTYSRYGMGWFRQAPGKREFVAAVSRLS GPRTVYADSVKGRFTISRDN AENTVYLQMNSLKPEDTAVYTCAAEL TNRNSGAYYYAWAYDYWGQGTQVTVSSAAAEQKLISEEDLN GAAHHHHHH

5 Se expusieron doce grupos de ratones que oscilaban en tamaño entre 4 y 6 animales con 1 DL50 del virus NIBRG-14 (véase la tabla B-26). El virus NIBRG-14 (Temperton NJ, Hoschler K, Major D *et al.* A sensitive retroviral pseudotype assay for influenza H5N1-neutralizing antibodies. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2007 1: 105-112) contiene la HA (con el sitio de escisión polibásico eliminado) y la NA del virus A/Vietnm/11941/2004 (H5N1). Los genes virales internos son del A/Puerto Rico/8/1934(H1N1). 4, 24, 48 y 72 tras la inoculación viral, se les inoculó a los ratones por vía intranasal 60 µg (202-c8)2 o 60 µg del Nanobody de control irrelevante (191-D3)2. Se monitorizaron los ratones diariamente para detectar pérdida de peso (tabla B-29) y el día 4 (96 horas) tras la infección viral, se sacrificaron los ratones para preparar homogenados de pulmón. Se determinaron los títulos virales infecciosos (tabla B-27) y el ARN viral (tabla B-28) en homogenados de pulmón.

15 En los pulmones de 4 ratones que recibieron el Nanobody (202-c8)2, 4 horas tras la inoculación viral, no pudo detectarse virus infeccioso en homogenados de pulmón obtenidos a las 96 horas tras la infección. Una comparación del ARN viral en estos pulmones con el de los pulmones de ratones que se trataron con (191-d3)2 demostró una reducción del 98,58 % del ARN viral.

20 En 3 de 5 ratones que recibieron el Nanobody (202-c8)2 24 horas tras la infección, no pudo detectarse virus infeccioso mientras que los títulos eran muy bajos en los dos animales restantes. Una comparación del ARN viral en estos pulmones con el de los pulmones de ratones que se trataron con (191-d3)2 demostró una reducción del 97,22 % del ARN viral. En pulmones de ratones que recibieron el Nanobody (202-c8)2, 48 horas tras la infección viral, se observó una reducción del 84,26 % de los títulos virales en comparación con títulos virales infecciosos en ratones tratados con (191-D3)2 a las 48 horas tras las infecciones. Una comparación del ARN viral en estos pulmones con el de los pulmones de ratones que se trataron con (191-d3)2 demostró una reducción del 88,08 % del ARN viral.

25 Incluso cuando se administró el Nanobody (202-c8)2 72 horas tras la exposición viral, se detectó muy poco virus infeccioso en homogenados de pulmón (es decir, una reducción del 84 % en comparación con ratones tratados con (191-d3)2). Una comparación del ARN viral en estos pulmones con el de los pulmones de ratones que se trataron con (191-d3)2 demostró una reducción del 38,21 % del ARN viral.

30 La administración de (202-c8)2 no solo inhibió la replicación viral, también previno la morbilidad inducida por virus. Tal como se muestra en la tabla B-29 y la figura 19, la administración de (202-c8)2 a las 4, 24 y 48 horas tras la

exposición viral protegió contra la pérdida de peso inducida por virus. Cuando se administró el Nanobody 72 tras la infección, esta reducción inducida por virus del peso corporal ya no se previno.

5 Globalmente, estos datos demostraron que una única administración terapéutica de un Nanobody neutralizante de virus incluso hasta 72 horas después de la infección viral inhibía sustancialmente la replicación viral. Además, se previno la prevención de la morbilidad inducida por virus mediante la administración del Nanobody hasta 48 horas tras la infección viral. Esto demuestra que la administración pulmonar de Nanobodies es un método poderoso para tratar infecciones pulmonares virales.

10 Tabla B-26. Grupos y número de ratones en cada grupo

	h tras la inoculación viral			
	4	24	48	72
(202-C8)2	4	5	6	6
(191-D3)2	4	5	6	6

15 Tabla B-27: Títulos virales infecciosos (TCID₅₀/ml) en homogenados de pulmón de ratones expuestos el día 0 e inoculados con Nanobodies a las 4, 24, 48 o 96 horas tras la infección

Jaula (número)	Nanobody	Administración de Nanobody (h p.i.)	TCID50/ml a las 96 h p.i.
1 (1)	(202-c8)2	4	0
1 (2)	(202-c8)2	4	0
1 (3)	(202-c8)2	4	0
1 (4)	(202-c8)2	4	0
2 (1)	(191-D3)2	4	79432826
2 (2)	(191-D3)2	4	25118864
2 (3)	(191-D3)2	4	158489319
2 (4)	(191-D3)2	4	> 1000000000
3 (1)	(202-c8)2	24	0
3 (2)	(202-c8)2	24	0
3 (3)	(202-c8)2	24	0
3 (4)	(202-c8)2	24	2511886
3 (5)	(202-c8)2	24	125893
4 (1)	(191-D3)2	24	100000000
4 (2)	(191-D3)2	24	158489319
4 (3)	(191-D3)2	24	79432823
4 (4)	(191-D3)2	24	158489319
4 (5)	(191-D3)2	24	> 1000000000
6 (1)	(202-c8)2	48	501187
6 (2)	(202-c8)2	48	158489319
6 (3)	(202-c8)2	48	12589254
6 (4)	(202-c8)2	48	158489319
6 (5)	(202-c8)2	48	158489319
6 (6)	(202-c8)2	48	158489319
7 (1)	(191-D3)2	48	79432823
7 (2)	(191-D3)2	48	501187233
7 (3)	(191-D3)2	48	> 1000000000
7 (4)	(191-D3)2	48	> 1000000000
7 (5)	(191-D3)2	48	501187233
7 (6)	(191-D3)2	48	> 1000000000
9 (1)	(202-c8)2	72	158489319
9 (2)	(202-c8)2	72	158489319
9 (3)	(202-c8)2	72	158489319
9 (4)	(202-c8)2	72	nd
9 (5)	(202-c8)2	72	nd
9 (6)	(202-c8)2	72	nd
10 (1)	(191-D3)2	72	> 1000000000
10 (2)	(191-D3)2	72	> 1000000000
10 (3)	(191-D3)2	72	> 1000000000
10 (4)	(191-D3)2	72	nd
10 (5)	(191-D3)2	72	nd
10 (6)	(191-D3)2	72	nd

Tabla B-28: Títulos virales (RT-PCR) en homogenados de pulmón de ratones expuestos el día 0 e inoculados con Nanobodies a las 4, 24, 48 o 72 horas tras la infección

Jaula (número)	Nanobody	Administración de Nanobody (h p.i.)	Cp promedio	DE	1/2 ^{Cp}	Promedio	% de reducción en comparación con (191-D3)2
1 (1)	(202-c8)2	4	33,23	0,19	9,90E-11	5,96E-08	98,58
1 (2)	(202-c8)2	4	34,21	0,45	5,05E-11		
1 (3)	(202-c8)2	4	30,05	0,40	8,98E-10		
1 (4)	(202-c8)2	4	22,01	0,06	2,37E-07		
2 (1)	(191-D3)2	4	18,78	0,36	2,23E-06	4,19E-06	0,00
2 (2)	(191-D3)2	4	18,53	0,44	2,65E-06		
2 (3)	(191-D3)2	4	18,36	0,42	2,97E-06		
2 (4)	(191-D3)2	4	16,78	0,18	8,92E-06		
3 (1)	(202-c8)2	24	24,64	0,25	3,82E-08	2,64E-07	97,22
3 (2)	(202-c8)2	24	22,91	0,27	1,27E-07		
3 (3)	(202-c8)2	24	24,53	0,39	4,13E-08		
3 (4)	(202-c8)2	24	19,99	0,22	9,58E-07		
3 (5)	(202-c8)2	24	22,62	0,27	1,55E-07		
4 (1)	(191-D3)2	24	17,58	2,70	5,10E-06	9,49E-06	0,00
4 (2)	(191-D3)2	24	17,03	1,40	7,49E-06		
4 (3)	(191-D3)2	24	16,27	0,30	1,27E-05		
4 (4)	(191-D3)2	24	16,06	0,07	1,46E-05		
4 (5)	(191-D3)2	24	17,01	0,02	7,58E-06		
6 (1)	(202-c8)2	48	24,24	0,31	5,04E-08	7,52E-07	88,08
6 (2)	(202-c8)2	48	19,26	0,31	1,60E-06		
6 (3)	(202-c8)2	48	21,15	0,27	4,30E-07		
6 (4)	(202-c8)2	48	19,87	0,23	1,04E-06		
6 (5)	(202-c8)2	48	19,81	0,07	1,09E-06		
6 (6)	(202-c8)2	48	21,66	0,02	3,01E-07		
7 (1)	(191-D3)2	48	17,15	0,23	6,86E-06	6,31E-06	0,00
7 (2)	(191-D3)2	48	17,69	0,06	4,73E-06		
7 (3)	(191-D3)2	48	18,17	0,41	3,39E-06		
7 (4)	(191-D3)2	48	16,95	0,05	7,88E-06		
7 (5)	(191-D3)2	48	16,82	0,49	8,62E-06		
7 (6)	(191-D3)2	48	17,26	0,11	6,36E-06		
9 (1)	(202-c8)2	72	21,66	0,41	3,02E-07	2,35E-06	38,21
9 (2)	(202-c8)2	72	18,30	0,12	3,10E-06		
9 (3)	(202-c8)2	72	18,09	0,23	3,58E-06		
9 (4)	(202-c8)2	72	18,93	0,06	2,00E-06		
9 (5)	(202-c8)2	72	18,26	0,18	3,19E-06		
9 (6)	(202-c8)2	72	18,97	0,16	1,94E-06		
10 (1)	(191-D3)2	72	17,74	0,33	4,56E-06	3,81E-06	0,00
10 (2)	(191-D3)2	72	18,15	0,27	3,45E-06		
10 (3)	(191-D3)2	72	18,38	0,03	2,94E-06		
10 (4)	(191-D3)2	72	18,11	0,05	3,54E-06		
10 (5)	(191-D3)2	72	17,75	0,07	4,53E-06		
10 (6)	(191-D3)2	72	18,00	0,06	3,82E-06		

Tabla B-29: Pesos corporales de ratones expuestos el día 0 e inoculados con Nanobodies a las 4, 24, 48 o 96 horas tras la infección

Jaula (número)	Nanobody	Administración de Nanobody (h p.i.)	Peso 4 h p.i.	Peso 24 h p.i.	Peso 48 h p.i.	Peso 72 h p.i.
1 (1)	(202-c8)2	4	18,06	17,22	17,06	17,32
1 (2)	(202-c8)2	4	18,94	18,77	18,65	18,54
1 (3)	(202-c8)2	4	18,61	18,02	17,86	17,97
1 (4)	(202-c8)2	4	18,18	17,92	17,67	17,38
2 (1)	(191-D3)2	4	18,16	17,84	17,54	15,11
2 (2)	(191-D3)2	4	18,14	17,40	17,28	15,35
2 (3)	(191-D3)2	4	18,63	18,15	17,69	15,78
2 (4)	(191-D3)2	4	18,83	18,29	17,98	15,37
3 (1)	(202-c8)2	24	18,05	17,41	17,55	18,15
3 (2)	(202-c8)2	24	18,11	17,41	17,42	16,97
3 (3)	(202-c8)2	24	18,34	17,93	18,41	18,49
3 (4)	(202-c8)2	24	18,18	18,07	18,19	18,35
3 (5)	(202-c8)2	24	16,62	16,29	15,81	16,24
4 (1)	(191-D3)2	24	18,56	18,05	17,42	15,33
4 (2)	(191-D3)2	24	18,06	17,27	17,48	15,46
4 (3)	(191-D3)2	24	19,34	18,82	18,69	16,47
4 (4)	(191-D3)2	24	19,23	18,85	18,61	16,48
4 (5)	(191-D3)2	24	18,03	17,62	17,07	15,09
6 (1)	(202-c8)2	48	19,14	18,38	18,67	17,22
6 (2)	(202-c8)2	48	17,67	17,84	17,95	16,91
6 (3)	(202-c8)2	48	18,19	17,57	17,75	16,92
6 (4)	(202-c8)2	48	18,04	17,89	18,00	16,49
6 (5)	(202-c8)2	48	17,91	17,56	18,08	16,71
6 (6)	(202-c8)2	48	18,22	17,81	18,24	15,91
7 (1)	(191-D3)2	48	18,70	17,70	18,18	15,59
7 (2)	(191-D3)2	48	18,89	18,97	19,02	16,65
7 (3)	(191-D3)2	48	18,03	17,19	17,59	15,76
7 (4)	(191-D3)2	48	17,44	16,78	17,12	14,87
7 (5)	(191-D3)2	48	19,08	19,00	19,32	16,98
7 (6)	(191-D3)2	48	18,18	17,84	18,38	16,47
9 (1)	(202-c8)2	72	18,86	17,86	18,08	17,23
9 (2)	(202-c8)2	72	17,36	18,12	17,98	16,81
9 (3)	(202-c8)2	72	18,21	17,40	17,80	15,97
9 (4)	(202-c8)2	72	17,77	16,33	16,64	15,42
9 (5)	(202-c8)2	72	17,91	18,24	18,33	16,69
9 (6)	(202-c8)2	72	17,65	17,84	17,91	17,69
10 (1)	(191-D3)2	72	17,93	18,03	18,36	16,57
10 (2)	(191-D3)2	72	18,30	16,86	17,18	15,40
10 (3)	(191-D3)2	72	17,60	18,02	17,94	16,80
10 (4)	(191-D3)2	72	16,40	17,06	17,24	15,91
10 (5)	(191-D3)2	72	18,19	17,43	17,60	16,55
10 (6)	(191-D3)2	72	18,05	17,48	17,65	16,09

Ejemplo 7: Uso de dispositivo nebulizador para la administración pulmonar de P23IL0075 para administración sistémica durante el estudio de eficacia preclínico.

5

Nombres de los constructos	SEQ ID NO	SEQ ID NO de ref.	Secuencia de aminoácidos
----------------------------	-----------	-------------------	--------------------------

P23IL0075 o 119A3v16- 9GS-ALB8- 9GS-81A12v5 (81A12v5 es igual a 81A12v4 con un reemplazo de (S49A))	5	Para 119A3v16 y 81a12v4 compárense SEQ ID NO: 2578 y SEQ ID NO: 2584 en el documento WO 2009/068627	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPAS GNIFNLLTIAWYRQAPGKGRELVATINSGSRTYYA DSVKGRFTISRDNSSKKTLYLQMNSLRPEDTAVYYC QTSGSGSPNFWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGR EFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSSKNTLYL QMNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSY DSWGQGTLLTVSS
---	---	---	---

5 Se diseñó este estudio para evaluar la capacidad de un Nanobody para alcanzar la circulación sistémica en cantidades terapéuticas cuando se administra por medio del pulmón usando un dispositivo nebulizador y para proporcionar protección contra una enfermedad inflamatoria sistémica. El Nanobody sometido a prueba era P23IL0075, que consiste en 2 elementos estructurales de Nanobody anti-IL23 y 1 elemento estructural de Nanobody anti-albúmina sérica (SEQ ID 5). Se comparó la eficacia *in vivo* de P23IL0075 en el modelo de esplenocitos de ratón *in vivo* agudo tras la administración pulmonar con la eficacia tras la administración subcutánea.

10 Ejemplo 7: Uso de dispositivo nebulizador para la administración pulmonar de P23IL0075 para administración sistémica durante el estudio de eficacia preclínico.

Nombres de los constructos	SEQ ID NO	SEQ ID NO de ref.	Secuencia de aminoácidos
P23IL0075 o 119A3v16- 9GS-ALB8- 9GS-81A12v5 (81A12v5 es igual a 81A12v4 con un reemplazo de (S49A))	5	Para 119A3v16 y 81a12v4 compárense SEQ ID NO: 2578 y SEQ ID NO: 2584 en el documento WO 2009/068627	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPAS GNIFNLLTIAWYRQAPGKGRELVATINSGSRTYYA DSVKGRFTISRDNSSKKTLYLQMNSLRPEDTAVYYC QTSGSGSPNFWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGR EFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSSKNTLYL QMNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSY DSWGQGTLLTVSS

15 Se diseñó este estudio para evaluar la capacidad de un Nanobody para alcanzar la circulación sistémica en cantidades terapéuticas cuando se administra por medio del pulmón usando un dispositivo nebulizador y para proporcionar protección contra una enfermedad inflamatoria sistémica. El Nanobody sometido a prueba era P23IL0075, que consiste en 2 elementos estructurales de Nanobody anti-IL23 y 1 elemento estructural de Nanobody anti-albúmina sérica (SEQ ID 5). Se comparó la eficacia *in vivo* de P23IL0075 en el modelo de esplenocitos de ratón *in vivo* agudo tras la administración pulmonar con la eficacia tras la administración subcutánea.

20 En resumen, se usaron ratones C57BL/6J hembra (adquiridos de Charles River), 10-12 semanas de edad y que pesaban aproximadamente 25 g. Se incorporó un periodo de aclimatación de al menos una semana antes del inicio

del experimento. Se administraron artículos de prueba 24 horas antes de la primera de las tres inyecciones de hIL-23 en $t = 0$ h, 7 h y 23 h. Se extirparon los bazo en $t = 31$ h. Se prepararon esplenocitos y se estimularon *ex vivo* durante 24 h tras lo cual se midieron los niveles de mIL-22 en el sobrenadante. El esquema del estudio se resume más adelante en la figura 20. Se administró fármaco a los animales a una dosis por vía subcutánea de 0,3 mg/kg, o a una dosis de 3 mg/kg o 7,8 mg/kg por medio de la vía pulmonar usando el dispositivo PennCentury MicroSprayer® (Penn-Century MicroSprayer - modelo IA-1C; punta de 1,25" tras la curva; jeringa de presión alta FMJ-250). Se administró la dosis de 3 mg/kg subcutánea como una muestra de 100 μ l, mientras que las dosis de 3 mg/kg y 7,8 mg/kg administradas pulmonares se administraron por vía intratecal en un volumen total de 50 μ l usando el dispositivo Microsprayer. Se formularon muestras de Nanobody P231L0075 en D-PBS + Tween20 al 0,01 %.

Además, se formuló la muestra de Nanobody P231L0017 de 7,8 mg/kg en histidina 10 mM pH 6, sacarosa al 10 % y se administró por vía intratecal usando el dispositivo Microsprayer. 24 horas tras la administración del fármaco, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 3 μ g de IL-23 humana (hIL23, IL23 humana completa, es decir compuesta por la subunidad alfa p19 (locus de GenBank: NM_016584) y la subunidad p40 de interleucina 12 (locus de GenBank: NM_002187) en un volumen de 100 μ l ($t = 0$). 7 horas y 23 horas tras esta primera inyección, los animales recibieron una inyección intraperitoneal adicional de 3 μ g de hIL-23. Los ratones del grupo A recibieron PBS en lugar de hIL-23 a los mismos puntos de tiempo.

Los grupos de prueba se muestran en la tabla B-30.

Tabla B-30: Visión general de los grupos de prueba.

Grupo	Artículo de prueba + vía	Inducción
A	-	3 \times PBS por vía intraperitoneal 100 μ l
B	PBT administrado por vía subcutánea (s.c.) 100 μ l	3 \times 3 μ g de H IL-23 por vía intraperitoneal 100 μ l
C	P231L0075 0,30 mg/kg administrado por vía subcutánea (s.c.) 100 μ l	3 \times 3 μ g H IL-23 por vía intraperitoneal 100 μ l
D	PBT administrado por vía intratecal (i.t.) 50 μ l	3 \times 3 μ g H IL-23 por vía intraperitoneal 100 μ l
E	P231L0075 3,0 mg/kg administrado por vía intratecal (i.t.) 50 μ l	3 \times 3 μ g H IL-23 por vía intraperitoneal 100 μ l
F	P231L0075 7,8 mg/kg administrado por vía intratecal (i.t.) 50 μ l	3 \times 3 μ g H IL-23 por vía intraperitoneal 100 μ l
G	P231L0075 7,8 mg/kg administrado por vía intratecal (i.t.) 50 μ l	3 \times 3 μ g H IL-23 por vía intraperitoneal 100 μ l

Exactamente 31 h tras la primera inyección de hIL-23, se extrajo sangre de los ratones para la preparación de suero y posteriormente se sacrificaron. Se extirparon los bazo y se procesaron adicionalmente para los experimentos *ex vivo*. Brevemente, se aislaron esplenocitos homogeneizando los bazo entre portaobjetos de vidrio esmerilados. Posteriormente, se lavaron los esplenocitos y se resuspendieron a una concentración de 10^6 células/ml en RPMI1640 complementado con FCS al 10 %, penicilina 10 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml, aminoácidos no esenciales al 1 %, piruvato de sodio al 1 %, HEPES 2,5 mM y 2-mercaptoetanol al 0,00035 %. Se sembraron las células a 200 000 células/200 μ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos recubierta previamente con anticuerpo de hámster anti-CD3e de ratón (5 μ g/ml en PBS, durante la noche a 4 °C). Para cada bazo, se sembraron 6 pocillos. Se incubaron las placas de 96 pocillos durante 24 horas en un incubador de CO₂ humidificado. Se usó un kit de ELISA de tipo sándwich comercial para IL-22 de ratón (Antigenix) para medir la cantidad de mIL-22 en cada uno de los 6 sobrenadantes de esplenocitos. Para cada ratón, se calculó la concentración de mIL-22 media a partir de las mediciones de 6 réplicas.

Los resultados se muestran en la figura 21, que es un gráfico que muestra los resultados obtenidos en este ejemplo 7 para la inhibición de la síntesis de mIL-22 en un ensayo de esplenocitos de ratón tras la administración pulmonar de P231L0075 usando el dispositivo PennCentury Microsprayer y en comparación con la inhibición de la síntesis de mIL-22 tras la administración subcutánea. Se normalizaron los resultados del grupo C a la concentración de mIL-22 media del grupo B, en el que solo se inyectó hIL-23. Se normalizaron los resultados de los grupos E, F y G a la concentración de mIL-22 media del grupo D, en el que se inyectó solo hIL-23. La administración subcutánea de Nanobody P231L0075 0,3 mg/kg bloqueó significativamente la síntesis de mIL-22 hasta niveles basales ($p = 0,009$). Sorprendentemente, también se mostró que la administración pulmonar del Nanobody P231L0075 7,8 mg/ml inhibía significativamente la síntesis de mIL-22 hasta niveles basales ($p < 0,0001$), demostrando que el Nanobody P231L0075 se libera de manera sistémica tras la administración pulmonar. Tampoco hubo diferencias en la eficacia terapéutica del Nanobody P231L0075 formulado en D PBS + Tween20 al 0,01 % ($p < 0,0001$) en comparación con el Nanobody P231L0075 formulado en histidina 10 mM pH 6, sacarosa al 10 % ($p < 0,0001$). De manera interesante, la administración pulmonar de una dosis de 3 mg/kg de P231L0075 también inhibió significativamente la síntesis de

mIL-22 ($p < 0,0001$). No hubo diferencias claras en la inhibición de la síntesis de mIL-22 mediante las dosis administradas pulmonares de 3 mg/kg ($p < 0,0001$) y 7,8 mg/kg.

Ejemplo 8: Circulación sistémica y funcionalidad de constructo de nanobodies/nanobody administrados de manera sistémica y por vía pulmonar

5

Secuencias usadas:

Nombre del constructo	SEQ ID NO	Ref. SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
4.10-Alb11	39	SEQ ID NO: 113 en el documento WO 2009080714	MAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLGY YAIGWFRQAPGNEREGLSVITSGGGAIYYADSVK GRFTISRDNVKNVTVSLQMNSLKPEDTAVYYCARV RAAFTSTTWTSPKWYDYWGQGTQVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFT FRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSSAAAEQKLISEEDLNGA AHHHHHH
IL6R202	40	SEQ ID NO: 568 en el documento WO20080 20079	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDI GWFRQAPGKREGVSGISSSDGNTYYADSVKGR FTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAEPD SSWYLDGSPEFFKYWGQGTQVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGTQVTVSS

10 Ejemplo 8.1: La administración intratecal de 2 dosis de 250 µg de Nanobodies 4.10 aumenta los niveles circulantes de leptina en ratones.

Un primer grupo de 10 ratones recibió dos dosis de 250 µg del constructo de Nanobody 4.10-Alb11 través de inoculación intratraqueal. Un segundo grupo de 10 ratones recibió dos dosis de 250 µg de constructo de Nanobody
15 IL6R202 a través de inoculación intratraqueal (i.t.). Un tercer grupo de 7 ratones recibió dos dosis de 250 µg de constructo de Nanobody 4,10-Alb11 a través de inyección intraperitoneal (i.p.). Un cuarto grupo de 7 ratones recibió dos dosis de 250 µg de constructo de Nanobody IL6R202 a través de inyección intraperitoneal. La primera dosis se administró el día 0, la segunda dosis el día 2. Se tomó sangre un día antes de que se administrara la primera dosis y un día después de que se administrara la segunda dosis. Se determinaron los niveles de leptina y Nanobody. Los
20 datos se representan como promedio ± DE.

Tal como se muestra en la figura 22, tras la inyección i.t. de dos dosis de 4.10-Alb1, este constructo de Nanobody 4.10-Alb1 se detectó claramente en la sangre ($11,7 \pm 6,08$ µg/ml). Esto es ~16 % de lo que se detectó tras las inyecciones i.p. ($73,8 \pm 61,5$ µg/ml). Debido a que el ensayo Elisa usado para cuantificar este Nanobody depende de
25 la interacción con un fragmento de receptor de leptina, estos datos indican que los Nanobodies presentes en la circulación tras la administración i.t. e i.p. eran Nanobodies intactos, funcionales. Esto estaba apoyado además ya que también se detectaron concentraciones aumentadas de leptina en la sangre de ratones tratados con este Nanobody independientemente de la vía de inoculación (figura 22b (i.t.) y figura 22c (i.p.)).

Ejemplo 8.2: Aumento dependiente de la dosis de los niveles circulantes de leptina tras la administración i.t. de 4 cantidades crecientes de constructos de Nanobody 4.10-Alb1

5 Se les administraron a los ratones cantidades crecientes de constructo de nanobody 4.10-Alb-1 el día 0, 3, 6 y 9. El día 0, los ratones recibieron 25 µg, el día 3 los ratones recibieron 50 µg, el día 6 los ratones recibieron 125 µg y el día 9 los ratones recibieron 250 µg de constructo de nanobody 4.10-Alb-1. Se administraron los Nanobodies por vía i.p. o i.t. Los grupos de i.t. consistían en 10 ratones, los grupos tratados por vía i.p. consistían en 7 ratones. Un día tras cada administración de constructo de Nanobody 4.10-Alb-1, se recogió sangre.

10 Tal como se muestra en la figura 23a, se detectaron los constructos de Nanobody 4.10-Alb1 e IL6R202 en la sangre tras cada inoculación i.t. La inoculación de una mayor cantidad dio como resultado mayores concentraciones presentes en sangre. Tal como se esperaba, las concentraciones de constructos de Nanobody en sangre eran mayores tras inyecciones i.p. Debido a que los ensayos Elisa usados para cuantificar estos constructos de Nanobody dependen de la interacción con un fragmento de receptor de leptina o fragmento de receptor de IL6, estos datos indican que los constructos de Nanobody presentes en la circulación tras la administración i.t. e i.p. eran constructos de Nanobody intactos, es decir funcionales.

15 Un día tras la inyección i.p. de 25 µg, los niveles de leptina ya estaban aumentados en comparación con animales a los que se les inyectó IL6R202 (figura 23b). Los niveles de leptina aumentaron adicionalmente tras cada inyección adicional con el constructo de Nanobody 4.10-Alb-1. Tras la inoculación intratecal se detectaron niveles de leptina aumentados por primera vez tras la inoculación de la segunda dosis de 50 µg (figura 23c). Los niveles aumentaron adicionalmente tras la inoculación de las dosis de 125 y 250 µg.

25 Ejemplo 8.3: Aumento del peso corporal tras la administración i.t. de 4 cantidades crecientes de Nanobodies 4.10

Durante el tratamiento con Nanobody tal como se describe en el ejemplo 8.2, se determinó diariamente el peso corporal de todos los animales. Tal como se esperaba, el peso corporal de ratones que recibieron 4.10-Alb1 por medio de inyecciones i.p. claramente aumentó (figura 24a) mientras que en los ratones control no aumentó (figura 24b). También para los ratones que se trataron por vía i.t. con el constructo de Nanobody 4.10-Alb1 el peso corporal mostró una tendencia a aumentar más que el peso corporal de animales tratados control (figura 24c y figura 24d)).

30 Para modelar el peso corporal en función del tiempo, al tiempo que se incorporan los diferentes grupos de tratamiento así como la variación dentro de los ratones, se ajustó un modelo mixto en SAS usando el siguiente código:

```
proc mixed data=Bodyweight;
class muis group day;
model Bodyweight=dag dag*group/s ;
repeated day/subject=muisc type=un rcorr r;
run;
```

35 La línea que comienza con "model" define el aspecto de la estructura fijada del modelo. Se incluye un término que corresponde al tiempo (día) y se incluye el término de interacción del tiempo con el grupo de tratamiento (grupo) porque se supone que el efecto sobre el peso corporal puede ser diferente para cada grupo de tratamiento. Obsérvese que el efecto principal del grupo ya no está en el modelo. Este término parece no ser significativo ($p = 0,125$), lo que significa que el peso corporal en el día -1 es el mismo para cada grupo de tratamiento. Esto último tiene sentido porque en el día -1 no se ha administrado aún ningún tratamiento al ratón. La variación dentro del ratón está cubierta por la afirmación repetida en el código de SAS anterior. Para esta variación debe encontrarse la estructura de correlación más apropiada para el punto de tiempo diferente. Comparando los criterios de AIC de varios modelos con diferentes estructuras de correlación, se obtuvo que la *no estructurada* era la correlación más apropiada. Esto significa que se ha estimado la correlación entre todos los diferentes puntos de tiempo, así como la varianza a cada punto de tiempo. La estructura de correlación resultante se mantiene para cada ratón y representa la variación dentro del ratón.

40 Los residuales del modelo mixto (véase la figura 24e) aparecen normalmente distribuidos y homogéneos puesto que no está presente ninguna violación de las suposiciones. Se está de acuerdo en que este modelo es un buen modelo para los niveles de peso corporal.

45 A partir de este modelo pueden derivarse los valores de p para la comparación entre los diferentes grupos de tratamiento. En la tabla B-31 se presentan los resultados de las pruebas estadísticas para comparar el aumento de peso corporal para diferentes grupos de tratamiento.

50 Tabla B-31 Pruebas estadísticas para comparar el aumento de peso corporal para diferentes grupos de tratamiento.

60

Tabla B-31 Estimaciones								
Etiqueta	Estimación	Error estándar	DF	Valor de t	Pr > t	Alfa	Inferior	Superior
Prueba 4.10-Alb1 frente a IL6R202 i.t.	0,07239	0,02090	39	3,46	0,0013	0,05	0,03010	0,1147
Prueba 4.10-Alb1 frente a IL6R202 i.p.	0,2364	0,02437	39	9,70	<0,0001	0,05	0,1871	0,2857
Prueba 4.10-Alb1 i.t. frente a 4.10-Alb1 i.p.	-0,1482	0,02294	39	-6,46	<0,0001	0,05	-0,1946	-0,1018

La primera fila en la tabla B-31 representa la prueba que compara los dos grupos de tratamiento i.t. con respecto a su aumento de peso corporal. A partir del valor de p (0,0013) puede concluirse que el aumento de peso corporal es significativamente mayor para el grupo de 4.10-Alb1 en comparación con el grupo de control (IL6R202). La diferencia estimada en el aumento del peso corporal es de 0,07239. La segunda fila en la tabla B-31 representa la prueba que compara los dos grupos de tratamiento i.p. con respecto a su aumento de peso corporal. A partir del valor de p (<0,0001) puede concluirse que el aumento del peso corporal es significativamente mayor para el grupo de 4.10-Alb1 en comparación con el grupo de control (IL6R202). La diferencia estimada en el aumento del peso corporal es de 0,2364. La tercera fila en la tabla B-31 representa la prueba que compara el grupo de tratamiento i.t. de 4.10-Alb1 con el grupo de tratamiento i.p. de 4.10-Alb1 con respecto a su aumento de peso corporal. A partir del valor de p (<0,0001) puede concluirse que el aumento del peso corporal es significativamente mayor para el grupo i.p. en comparación con el grupo i.t. La diferencia estimada en el aumento del peso corporal es de -0,1482. El modelo de peso corporal teórico con bandas de confianza correspondientes se presenta en la figura 24f y g.

15 Aspectos preferidos o realizaciones particulares descritos en la solicitud:

Aspectos del método:

- 20 1. Método de proporción y/o administración de una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a un mamífero, por ejemplo humano; en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se dirige contra al menos una diana; y en el que el método comprende la etapa de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar.
- 25 2. Método del aspecto 1, en el que el proceso de administración comprende la etapa de formar un aerosol que comprende dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo mediante un dispositivo de inhalador apropiado tal como, por ejemplo, un nebulizador, inhaladores líquidos de dosis medida y/o inhaladores de polvo seco, preferiblemente nebulizador de malla.
- 30 3. Método del aspecto 1 o aspecto 2, en el que se proporciona una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica de dicho mamífero, por ejemplo humano.
- 35 4. Método del aspecto 3, en el que el método es capaz de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica con una biodisponibilidad absoluta sustancial, por ejemplo con una biodisponibilidad absoluta que es de al menos el 10 %, preferiblemente el 20 %, más preferiblemente el 30 %, más preferiblemente el 40 %, más preferiblemente el 50 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo.
- 40 5. Método del aspecto 3, en el que la semivida o semivida terminal de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en la circulación sistémica es mayor de 5 horas, preferiblemente 6 horas o más, más preferiblemente 7, 8 o 9 horas o más, incluso más preferiblemente es de 10 horas, 15 horas, o 20 horas o más, más preferido es de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más días.
- 45 6. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es un Nanobody y/o constructo del mismo.
- 50 7. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un Nanobody, un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador; y un constructo que comprende o consiste esencialmente en 3 Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
- 55 8. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un Nanobody, y un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.

- 5 9. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador; y un constructo que comprende o consiste esencialmente en 3 Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
- 10 10. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
- 15 11. Método del aspecto 1, en el que el método comprende adicionalmente la etapa de usar un dispositivo de administración intranasal con el fin de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar del mamífero.
- 20 12. Método de cualquier aspecto previo, en el que el antígeno es un antígeno en el tejido pulmonar.
- 25 13. Método de cualquier aspecto previo, en el que el antígeno es un antígeno en el tejido pulmonar y se deriva de un microorganismo tal como un virus, por ejemplo VRS tal como, por ejemplo, RSV407 y variantes del mismo, por ejemplo variantes funcionales de RSV407 que tienen hasta 30, preferiblemente 25, 20, 15, 10 o 5 residuos de aminoácido mutados; o virus influenza aviar, un hongo, un parásito o una bacteria y también entidades alérgicas como proteína/ácaros del polvo doméstico
- 30 14. Método de cualquier aspecto previo, en el que el antígeno es un antígeno quimiomodulable expresado principalmente en el mamífero pero expresado también fuera del tejido pulmonar de dicho mamífero, por ejemplo es a) RANK-L, y el dominio variable individual de inmunoglobulina es, por ejemplo, RANKL008AA y variantes del mismo, por ejemplo variantes funcionales de RANKL008AA que tienen hasta 30, preferiblemente 25, 20, 15, 10 o 5 residuos de aminoácido mutados; o b) factor de von Willebrand y el dominio variable individual de inmunoglobulina es, por ejemplo, ALX-0081 y variantes del mismo, por ejemplo variantes funcionales de ALX-0081 que tienen hasta 30, preferiblemente 25, 20, 15, 10 o 5 residuos de aminoácido mutados; o c) leptina y el dominio variable individual de inmunoglobulina es 4.10-Alb1 y variantes del mismo, por ejemplo variantes funcionales de 4.10-Alb1 que tienen hasta 30, preferiblemente 25, 20, 15, 10 o 5 residuos de aminoácido mutados.
- 35 15. Método de cualquier aspecto previo, en el que una cantidad eficaz de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra una vez al día o una vez cada 2 a 7 días, preferiblemente una vez al día.
- 40 16. Método de cualquier aspecto previo, en el que una cantidad eficaz de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra una vez al día o una vez cada 2 a 7 días, preferiblemente una vez al día y en el que el constructo se administra preferiblemente de manera local.
- 45 17. Método de cualquier aspecto previo, en el que una cantidad eficaz de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra a la circulación sistémica cuando se administra una vez al día o una vez cada 2 a 7 días, preferiblemente una vez al día, en el que ninguno de dichos constructos se dirige contra una proteína sérica.
- 50 18. Método de cualquier aspecto previo, en el que aproximadamente el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80 % o menos de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es estable en el tejido pulmonar durante al menos 24 horas tras la administración de dicho constructo.
- 55 19. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho constructo comprende además un dominio variable individual de inmunoglobulina contra una proteína sérica, por ejemplo proteína sérica humana tal como albúmina sérica humana o Fc-IgG1 humana.
- 60 20. Método del aspecto 16, en el que la biodisponibilidad sistémica de dicho constructo es de hasta aproximadamente del 10 al 50 %, preferiblemente hasta el 20 %, más preferiblemente hasta el 30 %, incluso más preferiblemente hasta el 40 %, lo más preferido hasta el 50 %.
- 65 21. Método de cualquier aspecto previo, en el que la semivida terminal *in vivo* del dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en la circulación sistémica de, por ejemplo, ratas y/o humanos es al menos 5 veces mayor en comparación con la semivida *in vivo* del mismo dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo cuando se administra por vía intravenosa, más preferiblemente de 6 a 10 veces, lo más preferido aproximadamente 10 veces mayor.
22. Método de cualquier aspecto previo, en el que al menos uno del antígeno está implicado o desempeña un papel

en enfermedades respiratorias, por ejemplo EPOC, asma e infección por virus respiratorios.

23. Método de cualquier aspecto previo, en el que el mamífero es un humano, por ejemplo un humano con una enfermedad.

- 5 Aspectos de uso:
- 10 1. Uso de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para administrar una cantidad eficaz de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a un mamífero, por ejemplo humano; en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se dirige contra al menos un antígeno; y en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra al tejido pulmonar.
 - 15 2. Uso del aspecto A, en el que el proceso de administración comprende la etapa de formar un aerosol que comprende dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo mediante un dispositivo de inhalador apropiado tal como, por ejemplo, un nebulizador, inhaladores líquidos de dosis medida y/o inhaladores de polvo seco.
 - 20 3. Uso del aspecto A o aspecto B, en el que se proporciona una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica de dicho mamífero, por ejemplo humano.
 - 25 4. Uso del aspecto C, en el que la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad absoluta sustancial, por ejemplo con una biodisponibilidad absoluta que es de al menos el 10 %, preferiblemente el 20 %, más preferiblemente el 30 %, más preferiblemente el 40 %, más preferiblemente el 50 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo.
 - 30 5. Uso del aspecto C, en el que la semivida o semivida terminal de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en la circulación sistémica es mayor de 5 horas, preferiblemente 6 horas o más, más preferiblemente 7, 8 o 9 horas o más, incluso más preferiblemente es de 10 horas, 15 horas, o 20 horas o más, más preferido es de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más días.
 - 35 6. Uso de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es un Nanobody y/o constructo del mismo.
 - 40 7. Uso de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un Nanobody, un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador; y un constructo que comprende o consiste esencialmente en 3 Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
 - 45 8. Uso de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un Nanobody, y un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
 - 50 9. Uso de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador; y un constructo que comprende o consiste esencialmente en 3 Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
 - 55 10. Uso de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo que consiste en un constructo que comprende o consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
 - 60 11. Uso de cualquier aspecto previo, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra al mamífero, por ejemplo humano, usando un dispositivo de administración intranasal.
 - 60 12. Uso de cualquier aspecto previo, en el que el antígeno es un antígeno en el tejido pulmonar.
 13. Uso de cualquier aspecto previo, en el que el antígeno no es un antígeno en el tejido pulmonar.
 - 65 24. Uso de cualquier aspecto previo, en el que el antígeno es un antígeno en el tejido pulmonar y se deriva de un microorganismo tal como un virus, por ejemplo VRS tal como, por ejemplo, RSV407 y variantes del mismo, por ejemplo variantes de RSV407 funcional que tienen hasta 30, preferiblemente 25, 20, 15, 10 o 5 residuos de

aminoácido mutados, o virus de la gripe aviar, un hongo, un parásito o una bacteria y también entidades alérgicas como proteína/ácaros del polvo doméstico.

- 5 14. Uso de cualquier aspecto previo, en el que el antígeno es un antígeno quimiomodulable expresado principalmente en el mamífero pero expresado fuera del tejido pulmonar de dicho mamífero, por ejemplo RANK-L tal como, por ejemplo, RANKL008AA y variantes del mismo, por ejemplo variantes funcionales de RANKL008AA que tienen hasta 30, preferiblemente 25, 20, 15, 10 o 5 residuos de aminoácido mutados, o factor de von Willebrand tal como, por ejemplo, ALX-0081 y variantes del mismo, por ejemplo variantes funcionales de RANKL008AA que tienen hasta 30, preferiblemente 25, 20, 15, 10 o 5 residuos de aminoácido mutados.
- 10 15. Uso de cualquier aspecto previo, en el que una cantidad eficaz de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra a la circulación sistémica cuando se administra una vez al día o una vez cada 2 a 7 días, preferiblemente una vez al día.
- 15 16. Uso de cualquier aspecto previo, en el que una cantidad eficaz de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra una vez al día o una vez cada 2 a 7 días, preferiblemente una vez al día y en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra preferiblemente en el tejido pulmonar.
- 20 17. Uso de cualquier aspecto previo, en el que una cantidad eficaz de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se administra una vez al día o una vez cada 2 a 7 días, preferiblemente una vez al día, en el que ninguno de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se dirige contra una proteína sérica.
- 25 18. Uso de cualquier aspecto previo, en el que aproximadamente el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80 % o menos de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es estable en el tejido pulmonar durante al menos 24 horas tras la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo.
- 30 19. Uso de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo comprende además un dominio variable individual de inmunoglobulina contra una proteína sérica, por ejemplo proteína sérica humana tal como albúmina sérica humana o Fc-IgG1 humana.
- 35 20. Uso del aspecto Q, en el que la biodisponibilidad sistémica de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es de hasta aproximadamente del 10 al 50 %, preferiblemente hasta el 50 %.
- 40 21. Uso de cualquier aspecto previo, en el que la semivida terminal *in vivo* del dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en, por ejemplo, ratas es al menos 5 veces mayor en comparación con la semivida *in vivo* del mismo dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo cuando se administra por vía intravenosa, más preferiblemente de 6 a 10 veces, lo más preferido aproximadamente 10 veces mayor.
- 45 22. Uso de cualquier aspecto previo, en el que al menos uno del antígeno está implicado o desempeña un papel en enfermedades respiratorias, por ejemplo EPOC, asma e infección por virus respiratorios.
- i. Composiciones farmacéuticas y dispositivos de la descripción:
- 50 ii. Composición farmacéutica adecuada para administración pulmonar según un uso o método tal como se describe en los aspectos anteriores.
- 55 iii. Composición farmacéutica del aspecto i, en el que la composición comprende a) un constructo que comprende al menos un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo dirigido contra al menos un antígeno o que consiste esencialmente en al menos un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo dirigido contra al menos un antígeno; y b) que comprende opcionalmente excipientes adecuados tales como, por ejemplo, tampones, estabilizadores y/o propelentes.
- 60 iv. Composición farmacéutica del aspecto i o ii que se administra una vez al día o una vez cada 2 a 7 días, preferiblemente una vez al día.
- v. Composición farmacéutica del aspecto i al iii que es un líquido.
- vi. Composición farmacéutica del aspecto i al iii que es un polvo seco.
- 65 vii. Dispositivo farmacéutico adecuado en los métodos y/o usos descritos anteriormente y/o adecuado en el uso con una composición farmacéutica de los aspectos i a v.

viii. Dispositivo farmacéutico según la reivindicación vi que es un inhalador para líquidos tales como, por ejemplo, una suspensión de partículas sólidas finas o gotitas líquidas en un gas.

5 ix. Dispositivo farmacéutico según la reivindicación vi que es un inhalador de polvo seco.

Intervalo de dosificación:

10 a) Método de administración de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo, por ejemplo un Nanobody, al tejido pulmonar tal como se describió anteriormente; en el que dicha administración es una vez al día, una vez cada 2, 3, 4, 5, 6, o una vez cada semana, preferiblemente una vez cada día.

15 b) Método del aspecto a); en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo, por ejemplo un Nanobody, se administra a la circulación sistémica en una cantidad eficaz.

c) Uso de un agente de la invención para la administración una vez al día, una vez cada 2, 3, 4, 5, 6, o una vez cada semana, preferiblemente una vez cada día.

20 d) Uso del aspecto c); en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo, por ejemplo un Nanobody, se administra a la circulación sistémica en una cantidad eficaz.

El intervalo de dosificación para un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo anti-viral dirigido contra dicho virus en el que dicho virus puede provocar enfermedades del tracto respiratorio:

25 e) Método de tratamiento de infecciones del tracto respiratorio provocadas por un virus opcionalmente después de que se cierre la ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales con una única dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo; en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina se dirige contra dicho virus.

30 f) Método del aspecto e); en el que dicho tratamiento se realiza después de que se cierre la ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales.

g) Método del aspecto e) o f); en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina es un Nanobody.

35 h) Método del aspecto e), f) o g); en el que dichas infecciones del tracto respiratorio provocadas por un virus se seleccionan del grupo de gripe, bronquiolitis viral provocada por virus respiratorio sincitial (VRS) y enfermedades respiratorias provocadas por un adenovirus.

40 i) Método del aspecto e), f), g) o h); en el que dicha ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales se cierra después de 1 o más días tras las primeras infecciones, preferiblemente 2 o más días tras las primeras infecciones, más preferiblemente 3 o más días tras las primeras infecciones.

45 j) Método del aspecto e), f), g), h) o i); en el que dicha ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales se cierra después de 1 o más días tras los primeros síntomas de la enfermedad, preferiblemente 2 o más días tras los primeros síntomas de la enfermedad, más preferiblemente 3 o más días tras los primeros síntomas de la enfermedad.

50 k) Uso de un agente de la invención para tratar infecciones del tracto respiratorio provocadas por un virus opcionalmente después de que se cierre la ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales con una única dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo; en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina se dirige contra dicho virus.

55 l) Uso del aspecto k); en el que dicho tratamiento se realiza después de que se cierre la ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales.

m) Uso del aspecto k) o l); en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina es un Nanobody.

60 n) Uso del aspecto k), l) o m); en el que dichas infecciones del tracto respiratorio provocadas por un virus se seleccionan del grupo de gripe, bronquiolitis viral provocada por virus respiratorio sincitial (VRS) y enfermedades respiratorias provocadas por un adenovirus.

65 o) Uso del aspecto k), l), m) o n); en el que dicha ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales se cierra después de 1 o más días tras las primeras infecciones, preferiblemente 2 o más días tras las primeras infecciones, más preferiblemente 3 o más días tras las primeras infecciones.

p) Uso del aspecto k), l), m), n) u o); en el que dicha ventana terapéutica para medicamentos antivirales convencionales se cierra después de 1 o más días tras los primeros síntomas de la enfermedad, preferiblemente 2 o más días tras los primeros síntomas de la enfermedad, más preferiblemente 3 o más días tras los primeros síntomas de la enfermedad.

- 5 Aspectos particularmente preferidos:
1. Método de proporción y/o administración de una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a un mamífero, por ejemplo humano; en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se dirige contra al menos una diana; y en el que el método comprende la etapa de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar; en el que la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad sustancial, es decir
- 10
- 15 a. en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en esencialmente no más de 150, más preferiblemente 140, incluso más preferiblemente 130, lo más preferido no más de 120 residuos de aminoácido (por ejemplo, consiste en un Nanobody monovalente) la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 10 %, preferiblemente el 15 %, lo más preferiblemente el 20 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo; o
- 20
- b. en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en esencialmente no más de 300, más preferiblemente 280, incluso más preferiblemente 260, lo más preferido no más de 240 residuos de aminoácido (por ejemplo, consiste en dos Nanobodies monovalentes y un ligador) la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 5 %, preferiblemente el 7,5 %, lo más preferiblemente el 10 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo; o
- 25
- 30 c. en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en esencialmente no más de 450, más preferiblemente 420, incluso más preferiblemente 390, lo más preferido no más de 360 residuos de aminoácido (por ejemplo, consiste en tres Nanobodies monovalentes y dos ligadores) la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 5 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo.
- 35
2. Método de administración de una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a un humano; en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se dirige contra al menos un antígeno; y en el que el método comprende la etapa de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar.
- 40
3. Método de los aspectos 1 o 2, en el que el proceso de administración comprende la etapa de formar un aerosol que comprende dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo mediante un dispositivo de inhalador apropiado tal como por ejemplo un nebulizador de malla.
- 45
4. Método de los aspectos previos, en el que se proporciona una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica de dicho humano.
- 50
5. Método del aspecto 4, en el que el método es capaz de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica con una biodisponibilidad absoluta que es de al menos el 10 % tras la administración de una administración de dosis individual de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo.
- 55
6. Método del aspecto 4, en el que la semivida terminal de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en la circulación sistémica es mayor de 5 horas.
- 60
7. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es un Nanobody y/o constructo del mismo.
- 60
8. Método de cualquier aspecto previo, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo de un Nanobody, un constructo que consiste esencialmente en dos Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador; y un constructo que consiste esencialmente en 3 Nanobodies dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.
- 65

9. Método de administración de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar según los aspectos 1 a 8; en el que dicha administración es una vez al día.

REIVINDICACIONES

1. Dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo dirigido contra al menos un antígeno para su uso en un método de tratamiento mediante la administración de una cantidad eficaz de un dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica de un humano por medio de la vía pulmonar; en el que el método comprende la etapa de administrar dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo al tejido pulmonar a intervalos de dosificación de una vez al día o más.
2. Dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que el procedimiento de administración comprende la etapa de formar un aerosol que comprende dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo mediante un dispositivo de inhalador apropiado.
3. Dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad:
 - a) en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en no más de 150 residuos de aminoácido, la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 10 % tras la administración de una administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo;
 - b) en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en no más de 300 residuos de aminoácido, la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 7,5 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo; o
 - c) en el caso en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo consiste en no más de 450 residuos de aminoácido, la administración de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo a la circulación sistémica se logra con una biodisponibilidad (en comparación con inyección i.v.) que es de al menos el 5 % tras la administración de una única dosis de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo.
4. Dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la semivida terminal de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo en la circulación sistémica es mayor de 5 horas.
5. Dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo es un V_{HH} , un V_{HH} humanizado y/o constructo del mismo.
6. Dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y/o constructo del mismo se selecciona del grupo de un V_{HH} , un V_{HH} humanizado, un constructo que consiste en dos V_{HH} o V_{HH} humanizados dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador; y un constructo que consiste en 3 V_{HH} o V_{HH} humanizados dirigidos contra los mismos o diferentes antígenos conectados opcionalmente mediante un ligador.

Figura 1:

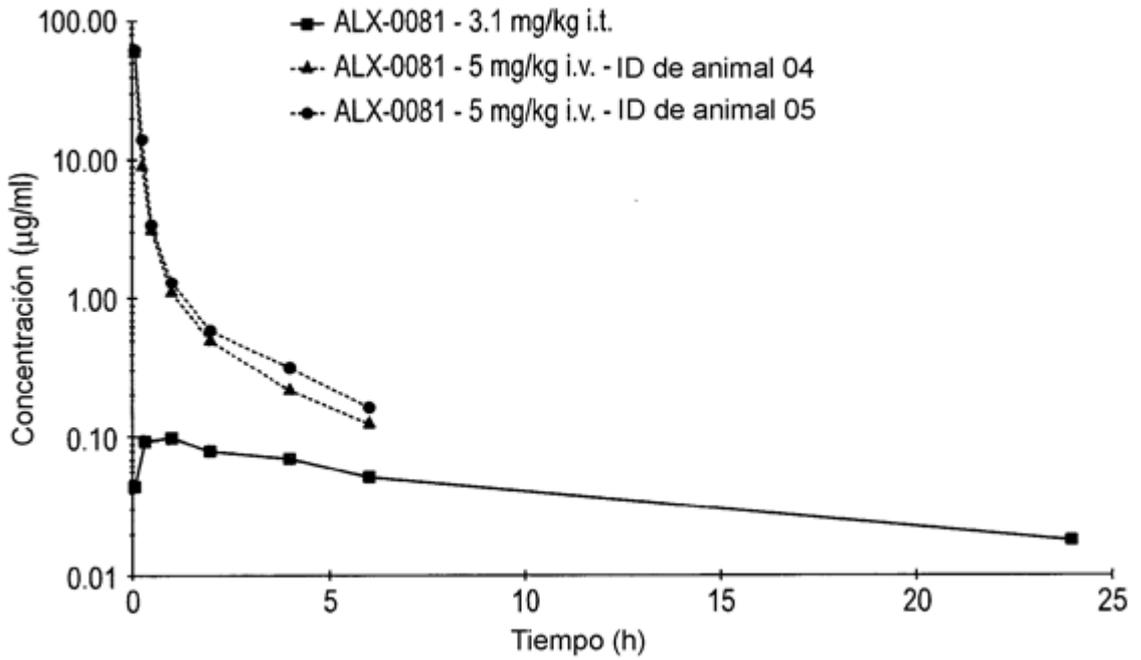


Figura 2:

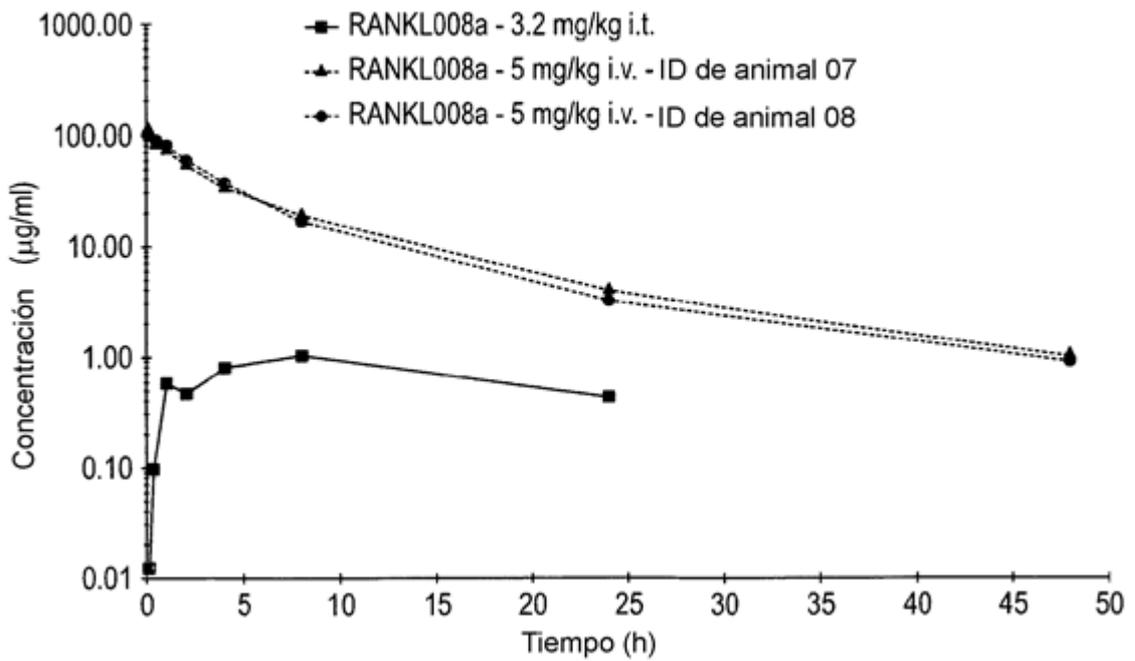


Figura 3:

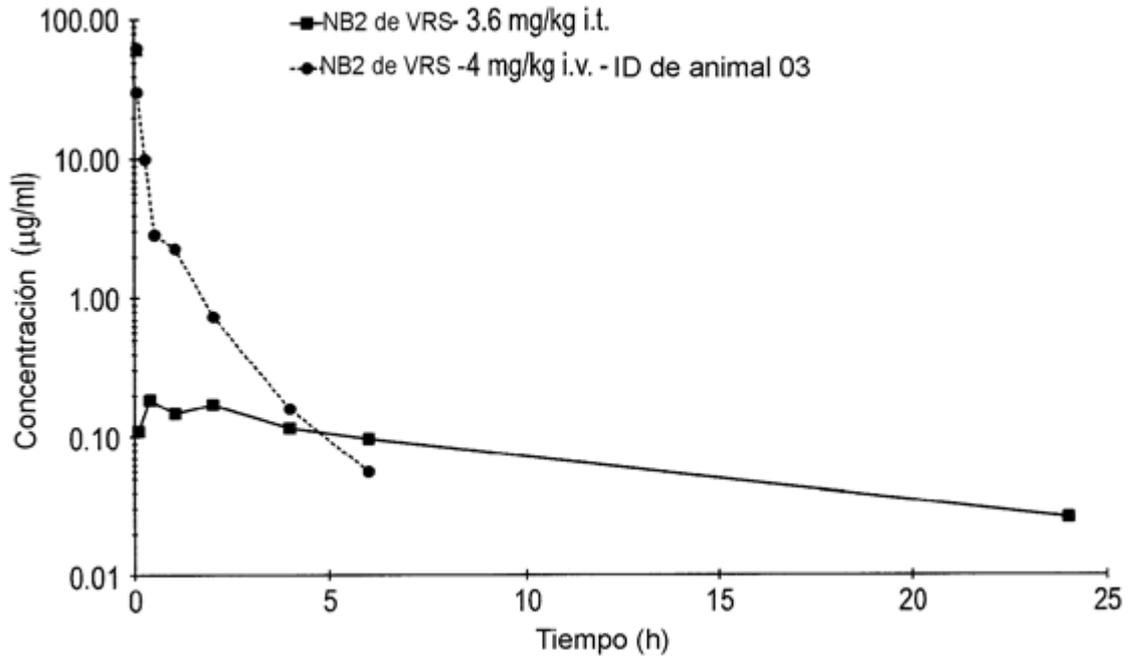


Figura 4:

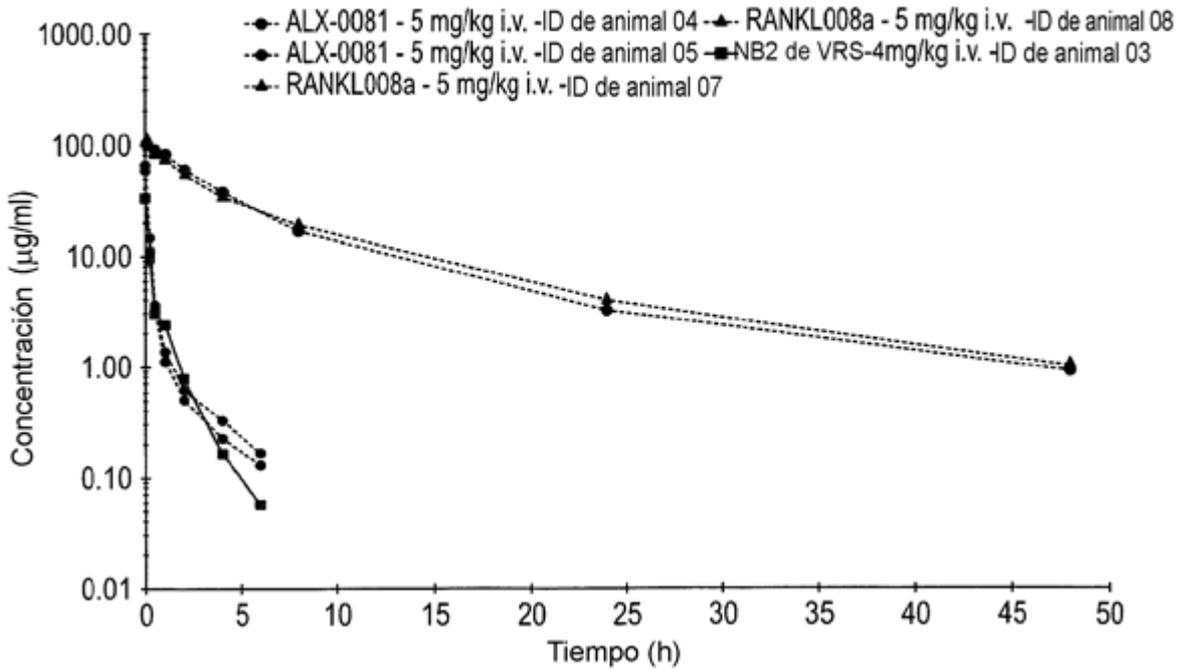


Figura 5:

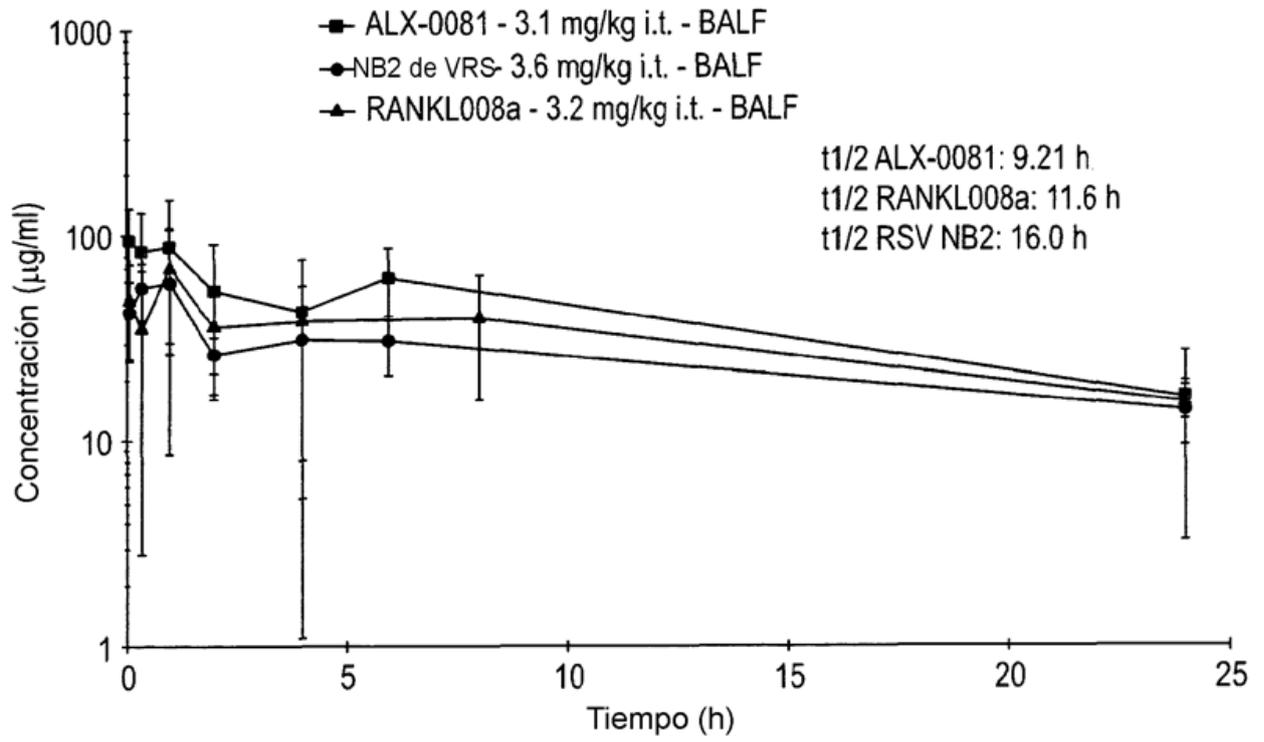
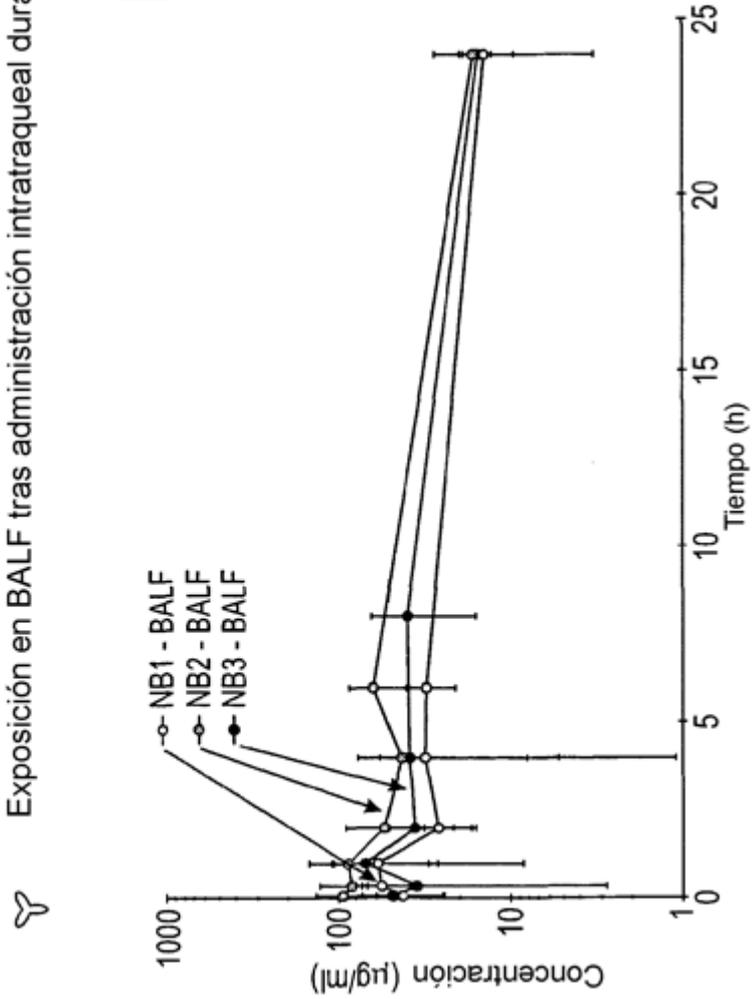


Figura 6: Nanobodies administrados por vía pulmonar son estables en el pulmón durante al menos 24 horas tras la administración

Exposición en BALF tras administración intratraqueal durante al menos 24 horas



Fracción de dosis	Fracción máxima (%)	Fracción de 24 h (%)
NB1- RSV NB2	35.7 - 49.5	8.46 - 12.4
NB2- ALX- 0081	74.0 - 98.3	12.5 - 16.5
NB3- RANKL0 08a	47.1 - 67.4	11.4 - 15.0

Figura 7: Biodisponibilidad en plasma de nanocuerpos administrados por vía pulmonar frente a nanocuerpos administrados por vía i.v.

administración intravenosa	aclaramiento (ml/h/kg)	semivida terminal (h)	administración intratraqueal	biodisponibilidad (%)	semivida terminal (h)
NB1-RSV NB2	363	0.926	NB1-RSV NB2	22.1	9.48
NB2-ALX-0081	337	2.06	NB2-ALX-0081	13.9	10.5
NB3-RANKL008a	9.00	12.6	NB3-RANKL008a	6.9	13.0

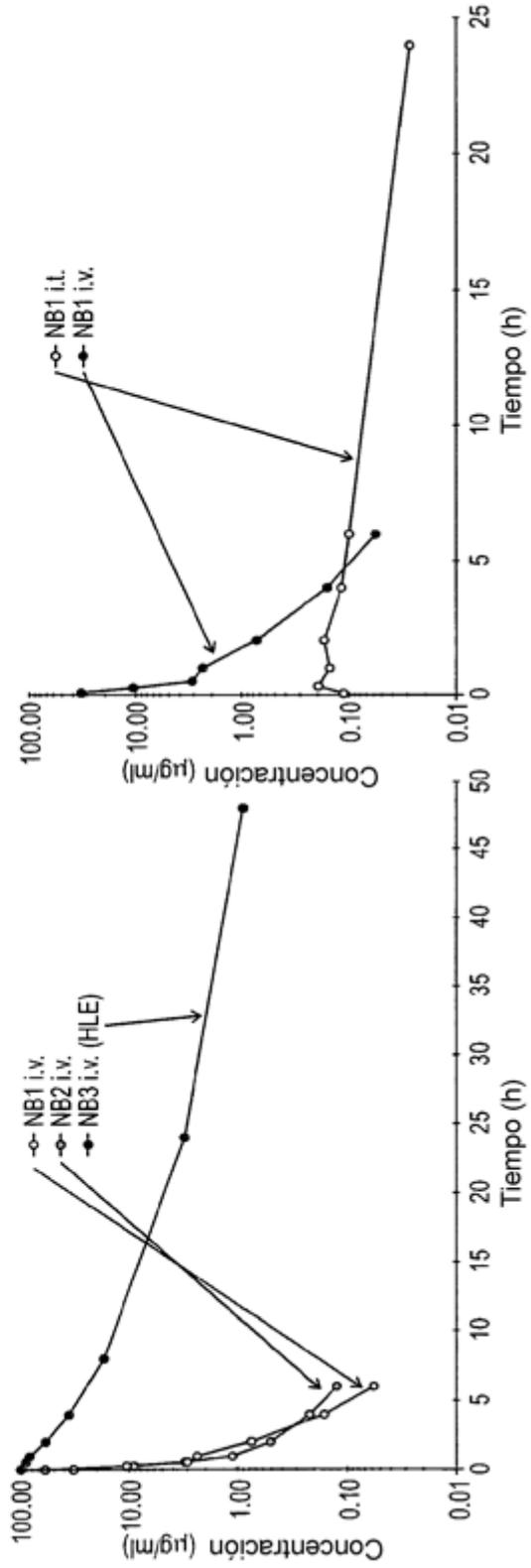


Figura 8:

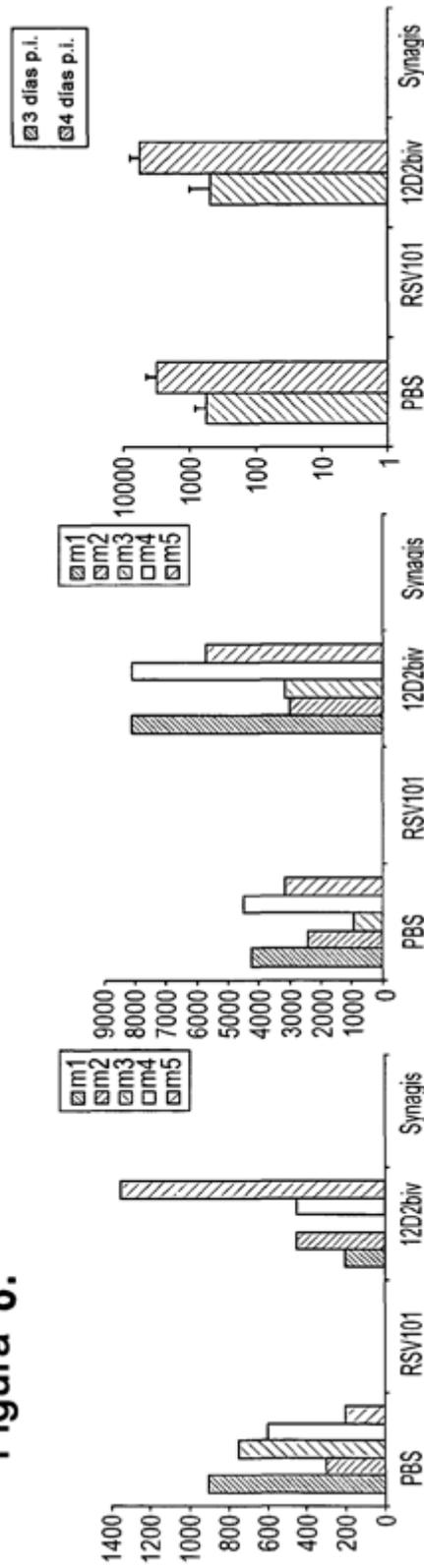


Figura 9:

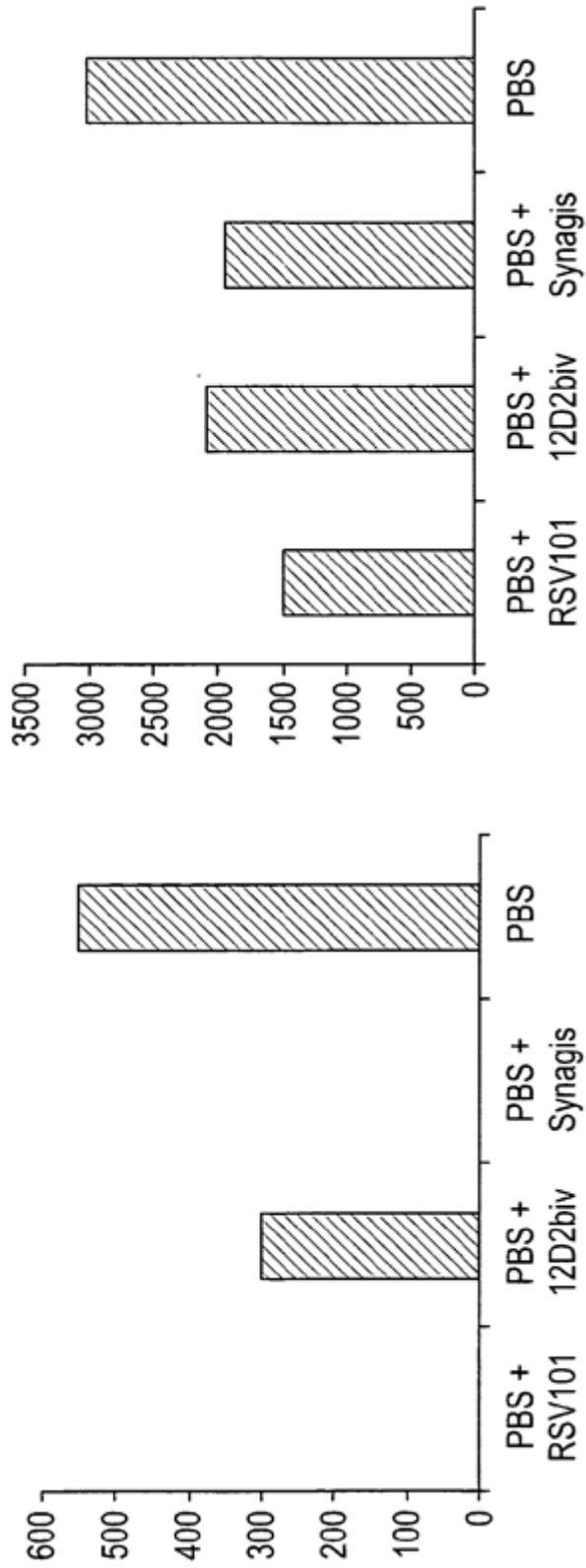


Figura 10:

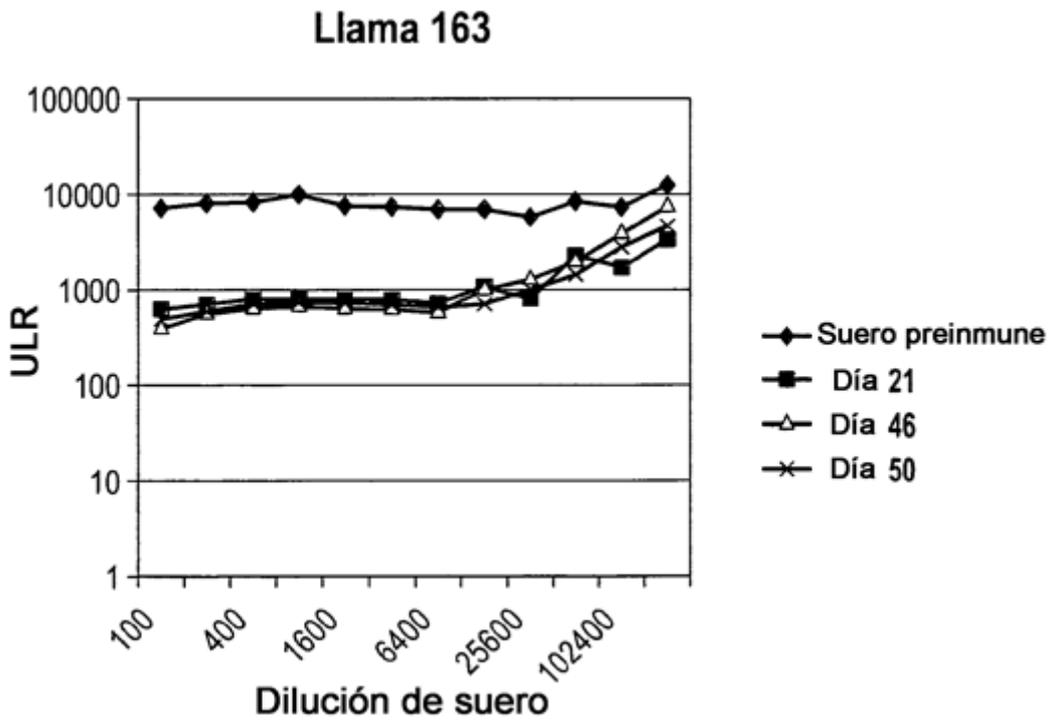
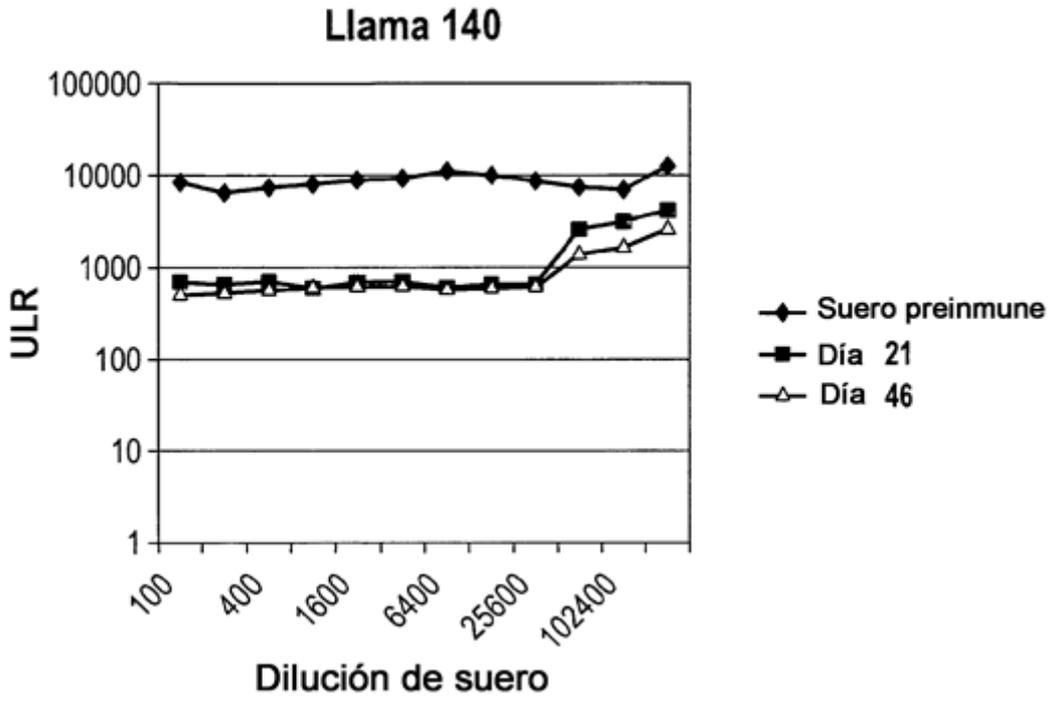


Figura 11:

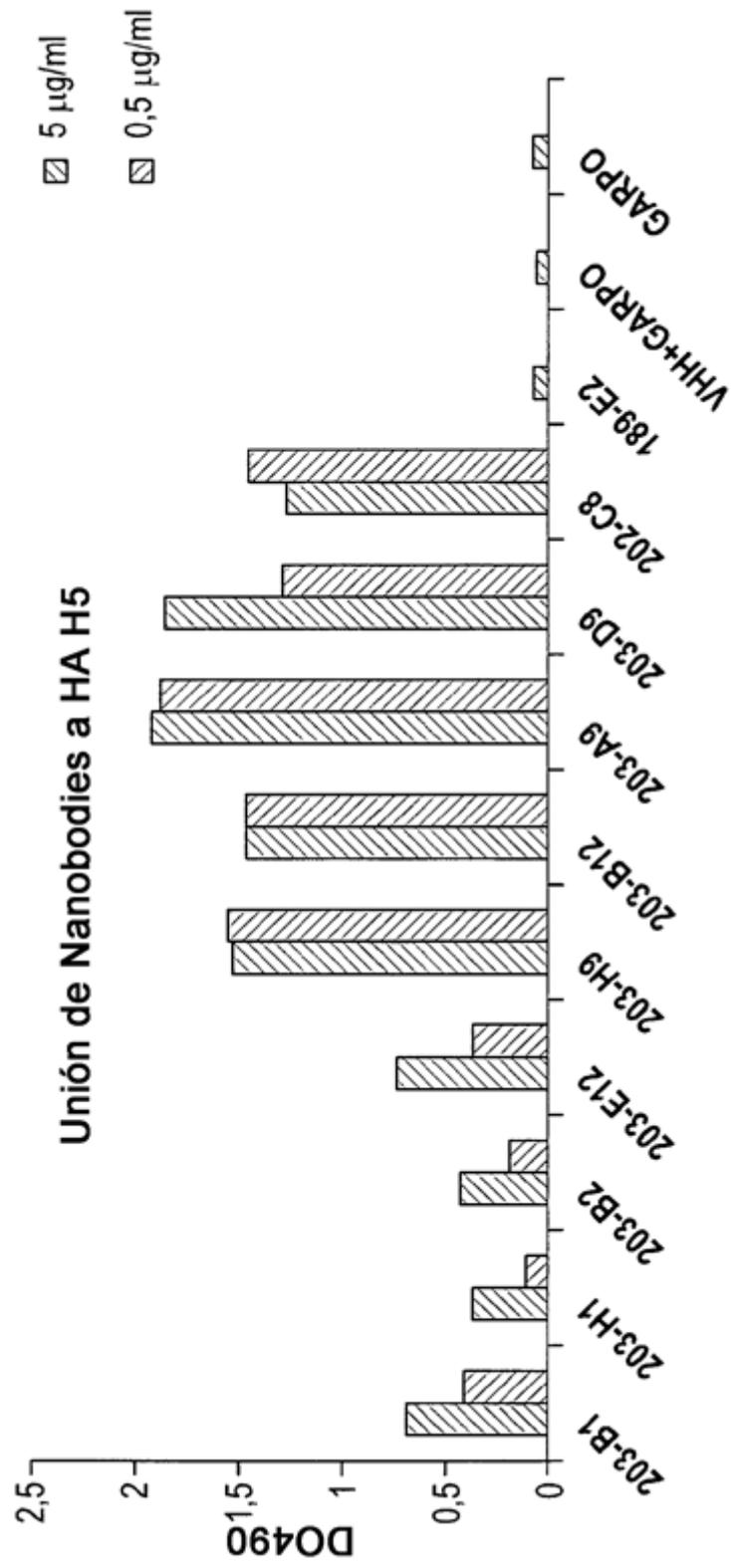


Figura 12:

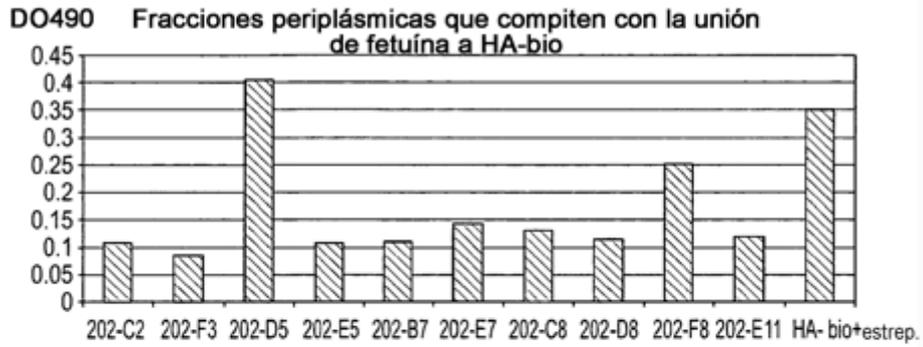
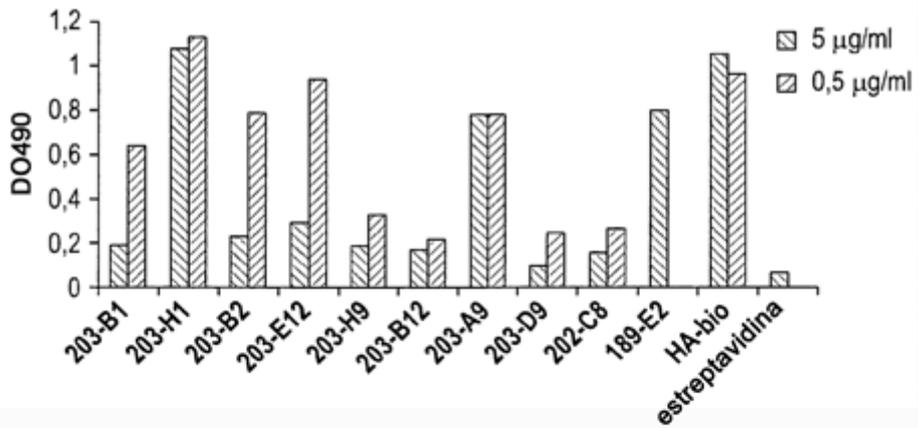


Figura 13:

Inhibición mediada por Nanobody de la interacción de HA H5 con fetuina



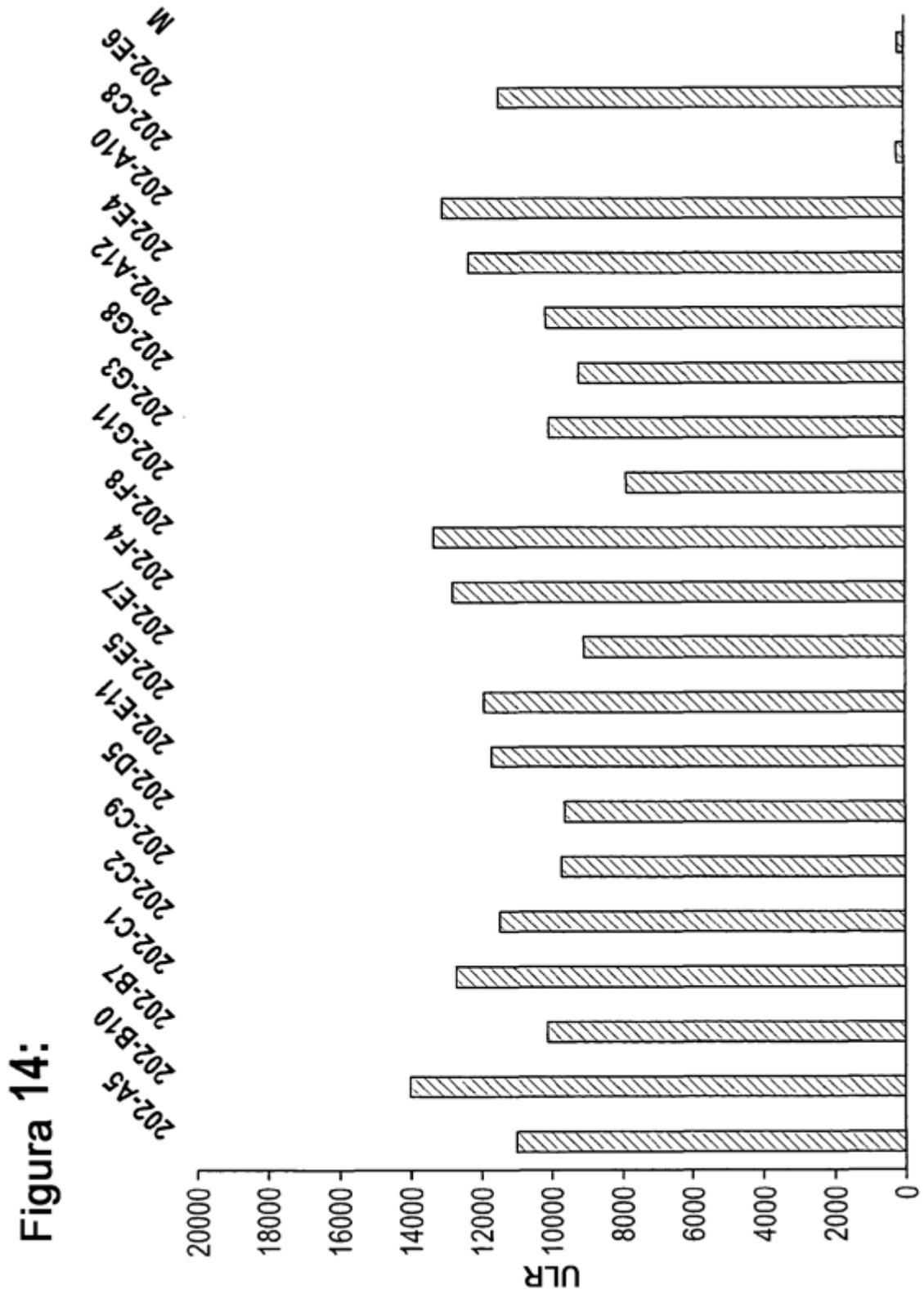


Figura 15:

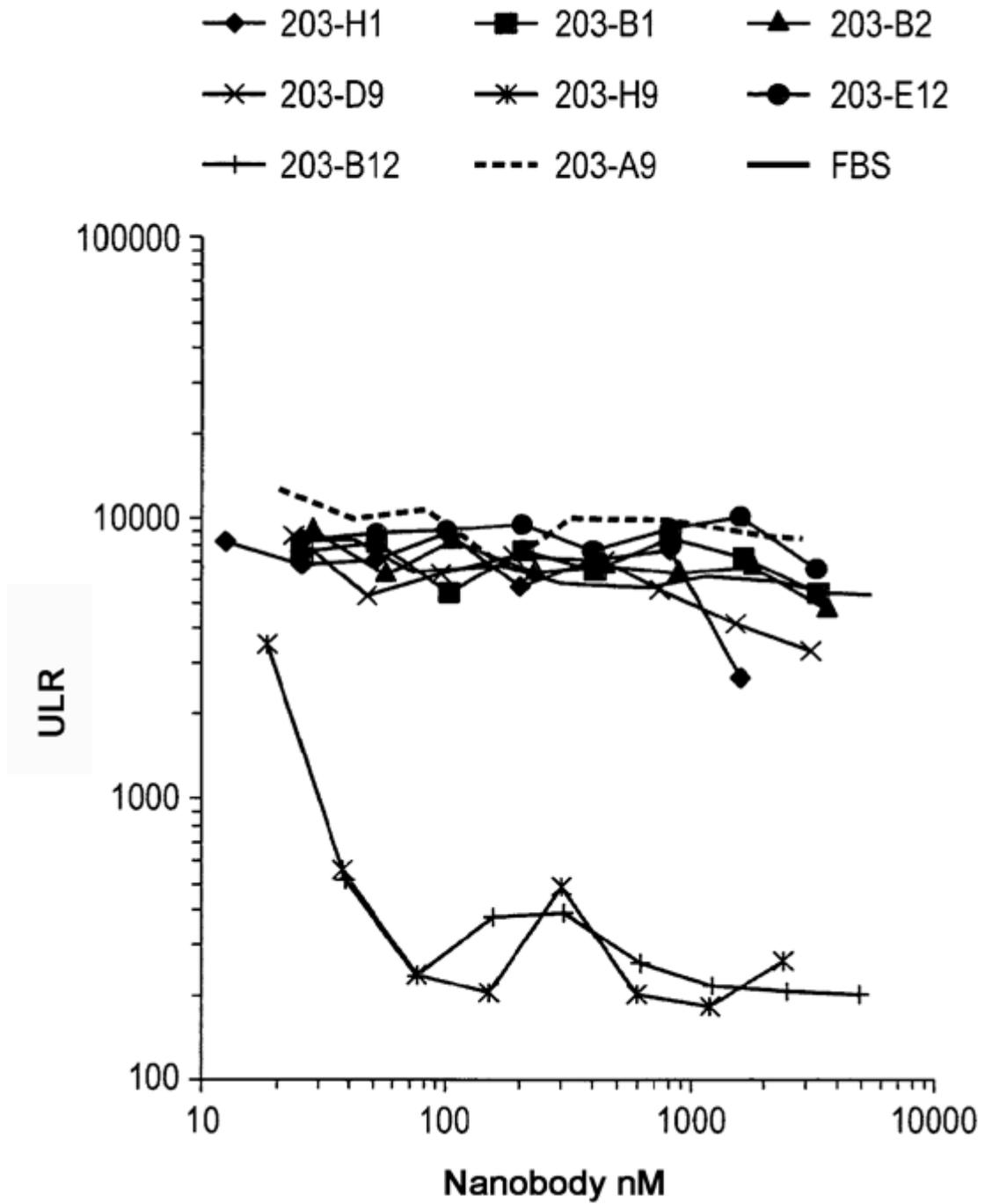


Figura 16:

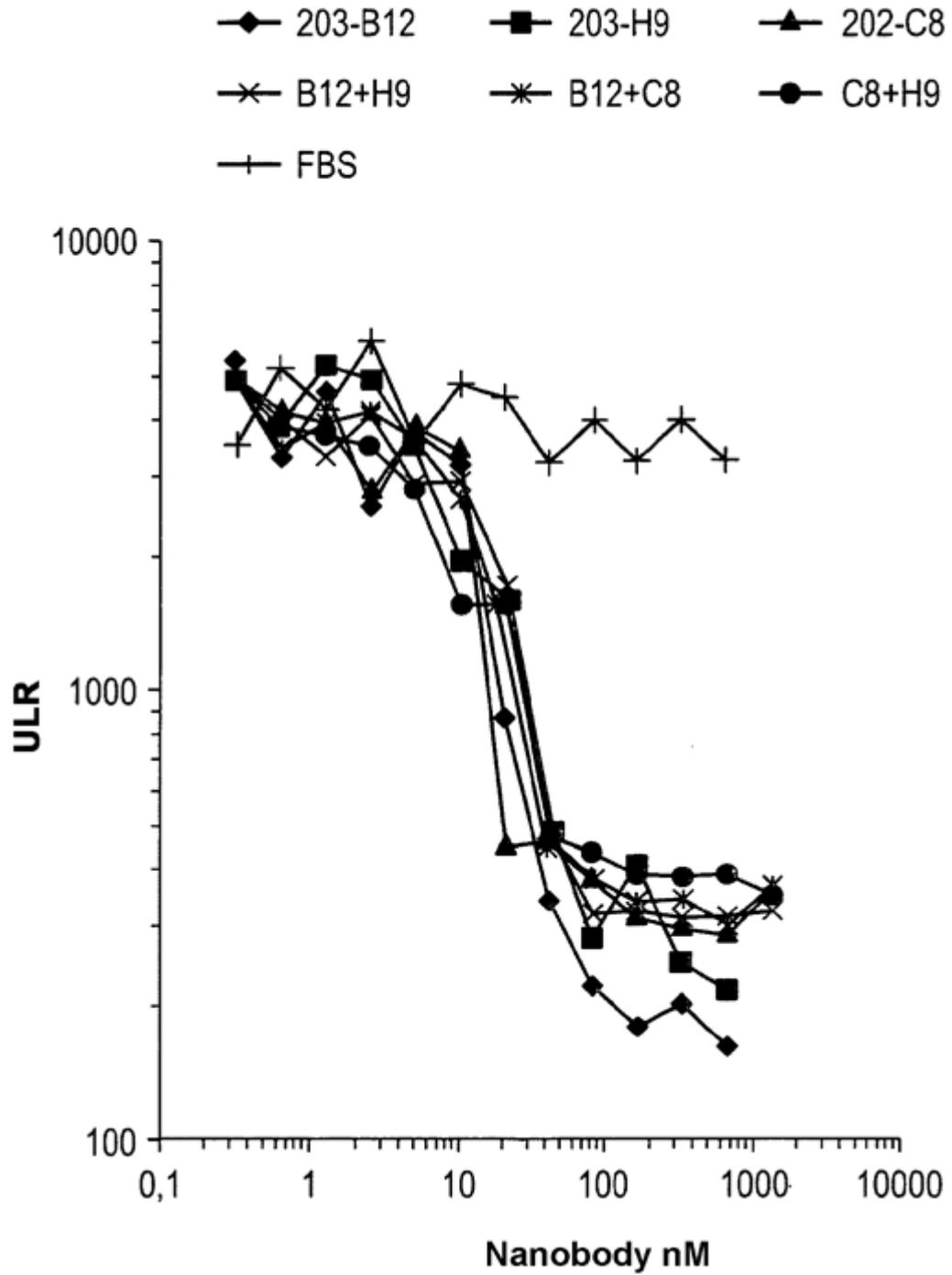


Figura 17:

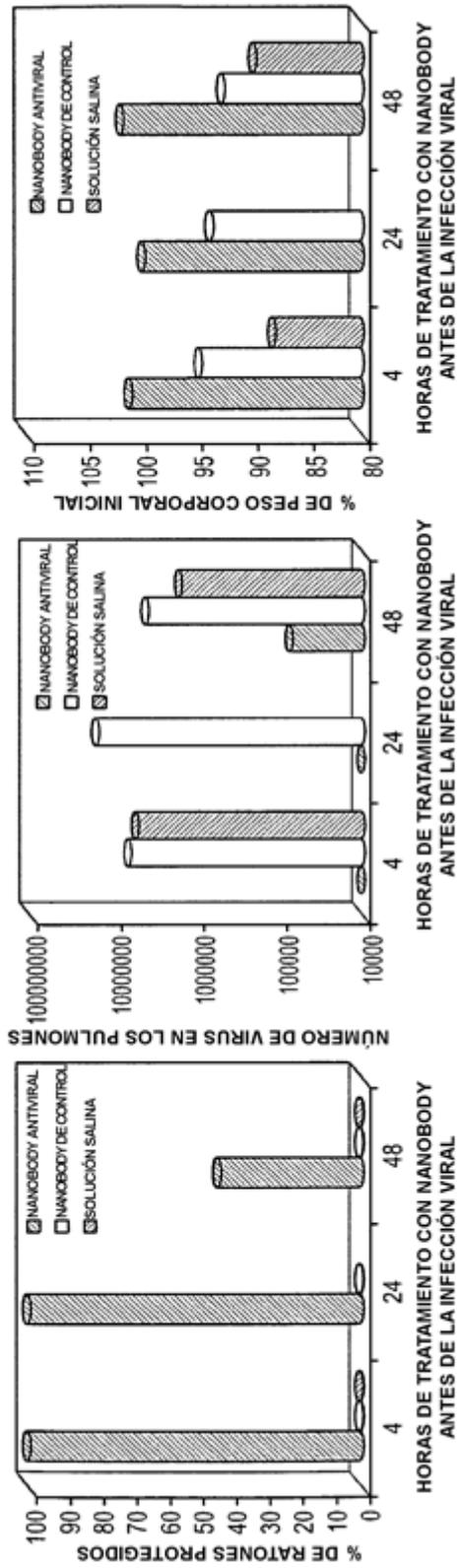


Figura 18:

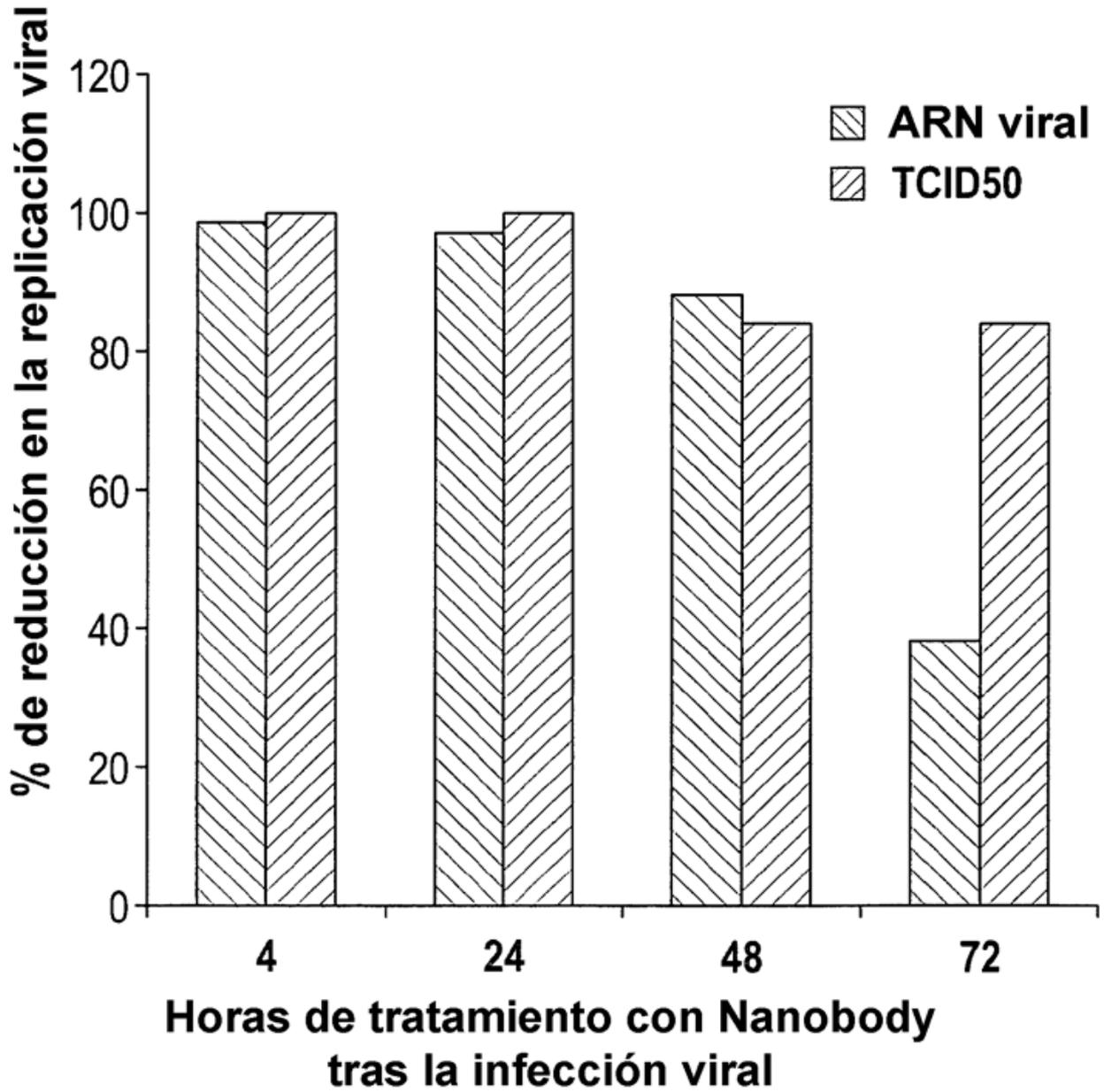


Figura 19:

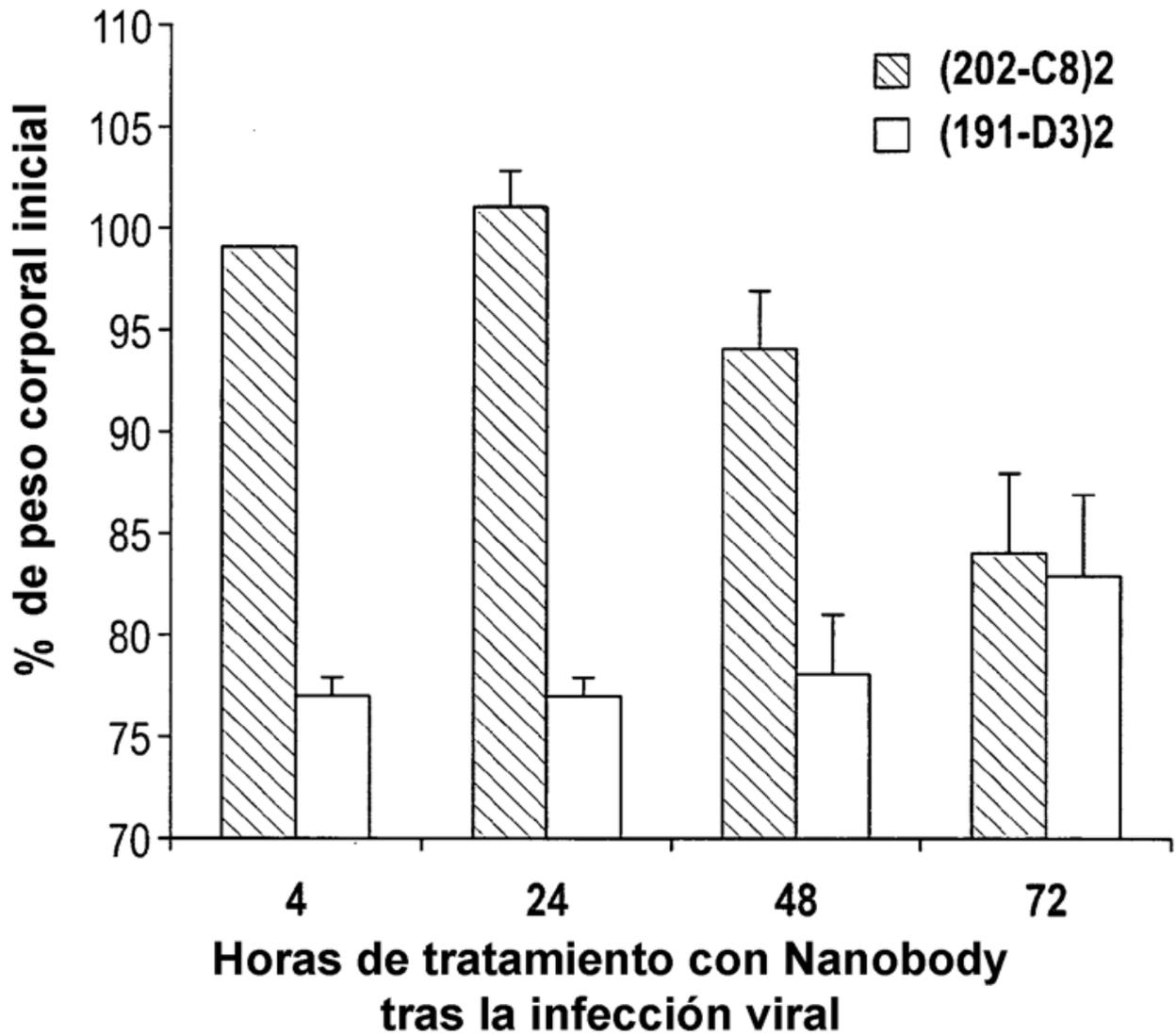


Figura 20:

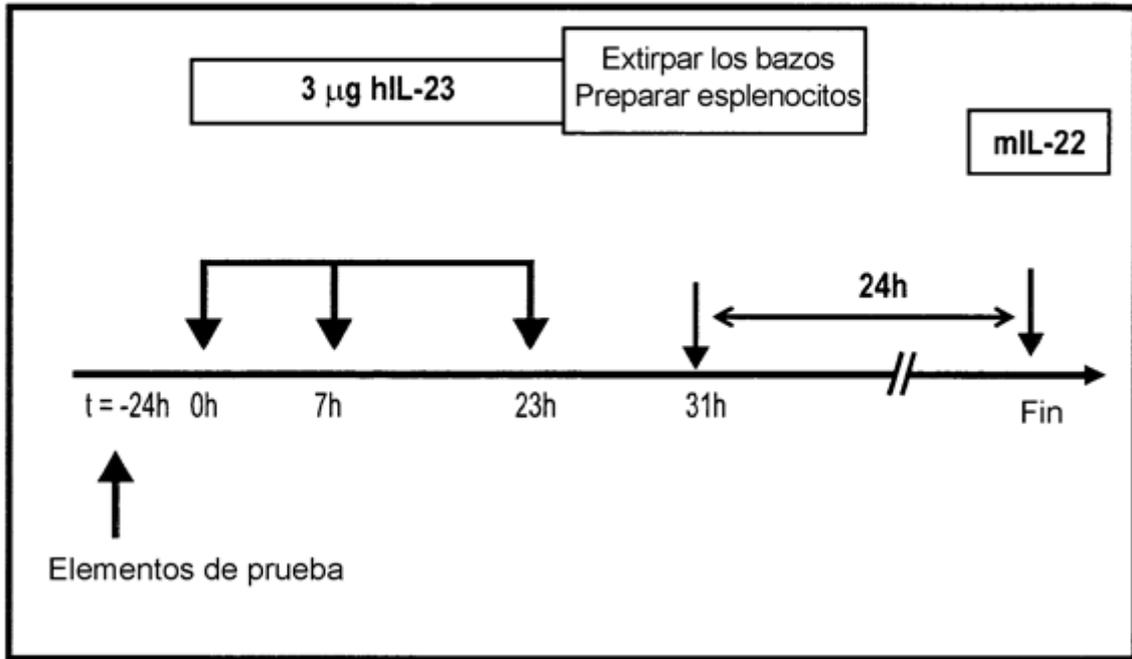


Figura 21:

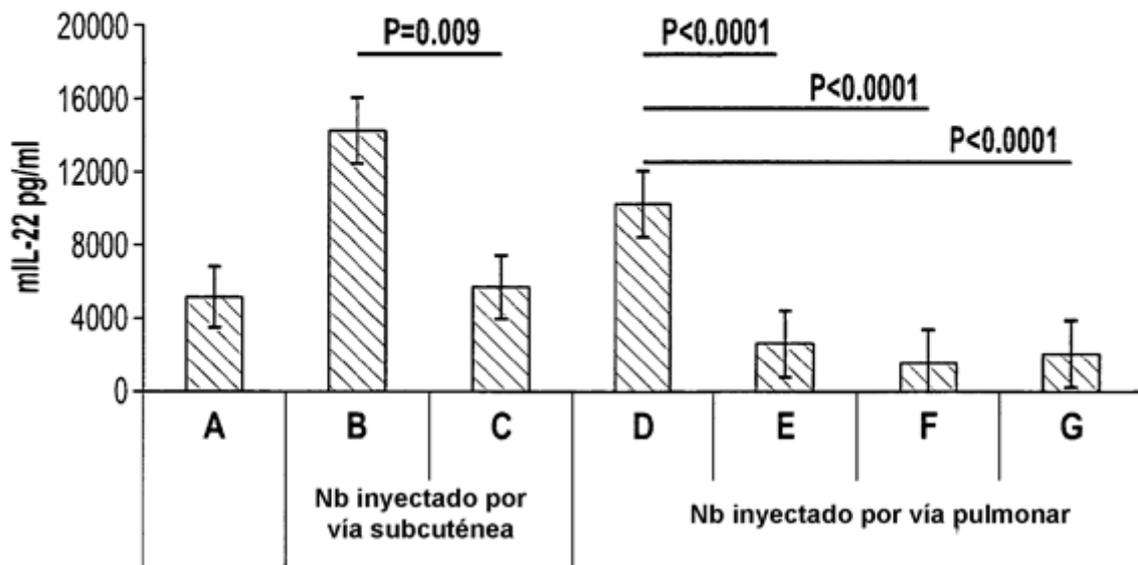


Figura 22a:

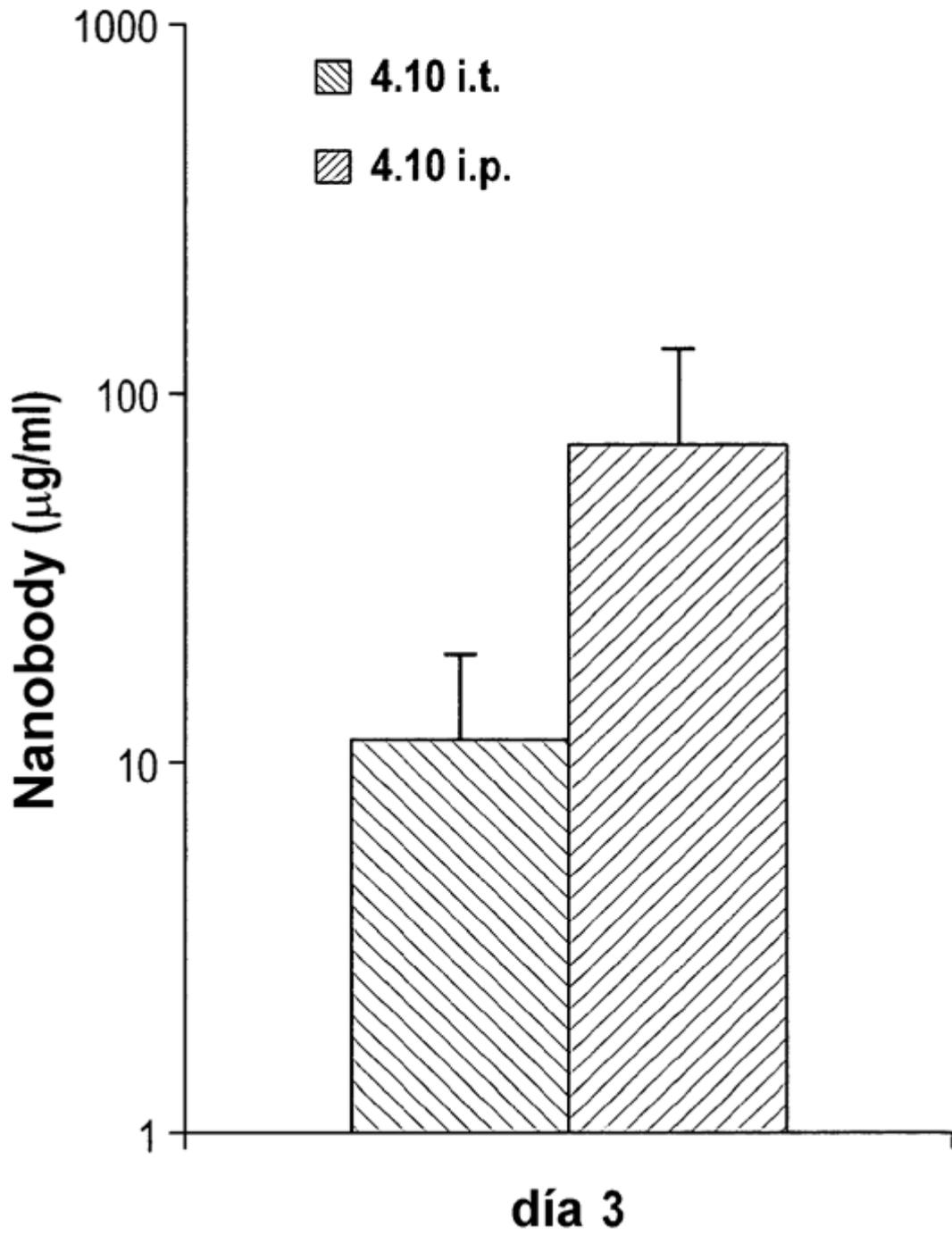


Figura 22b:

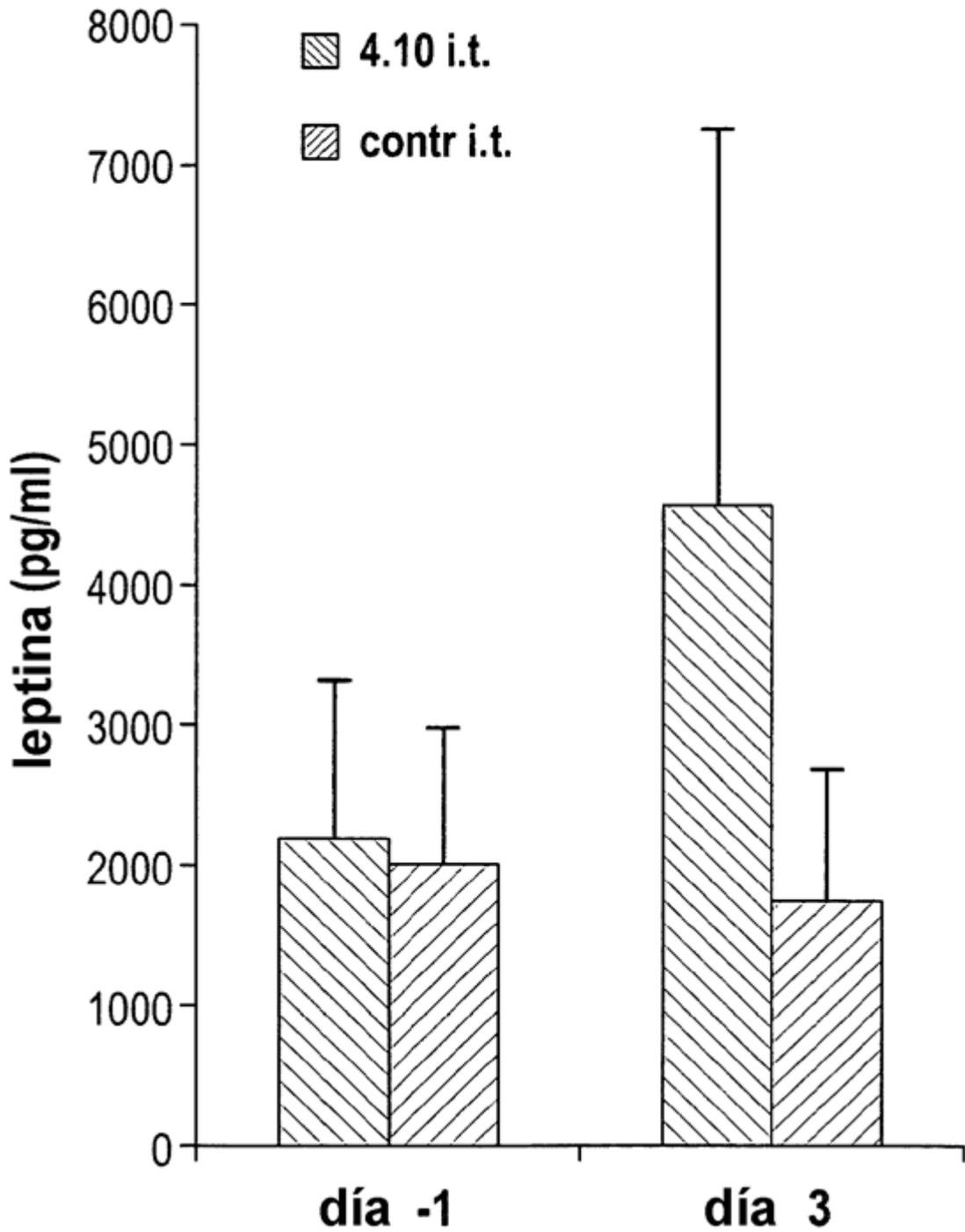


Figura 22c:

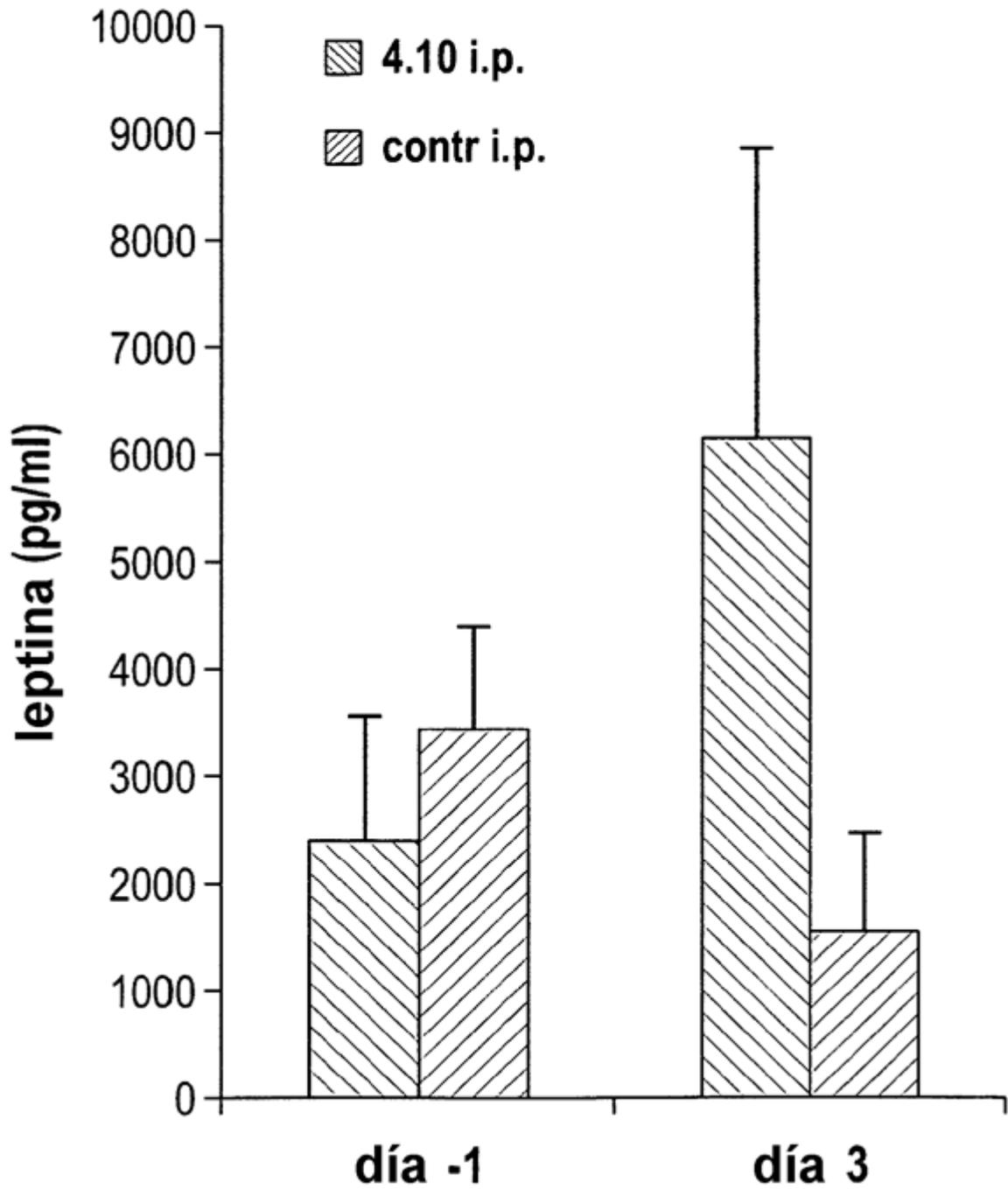


Figura 23a:

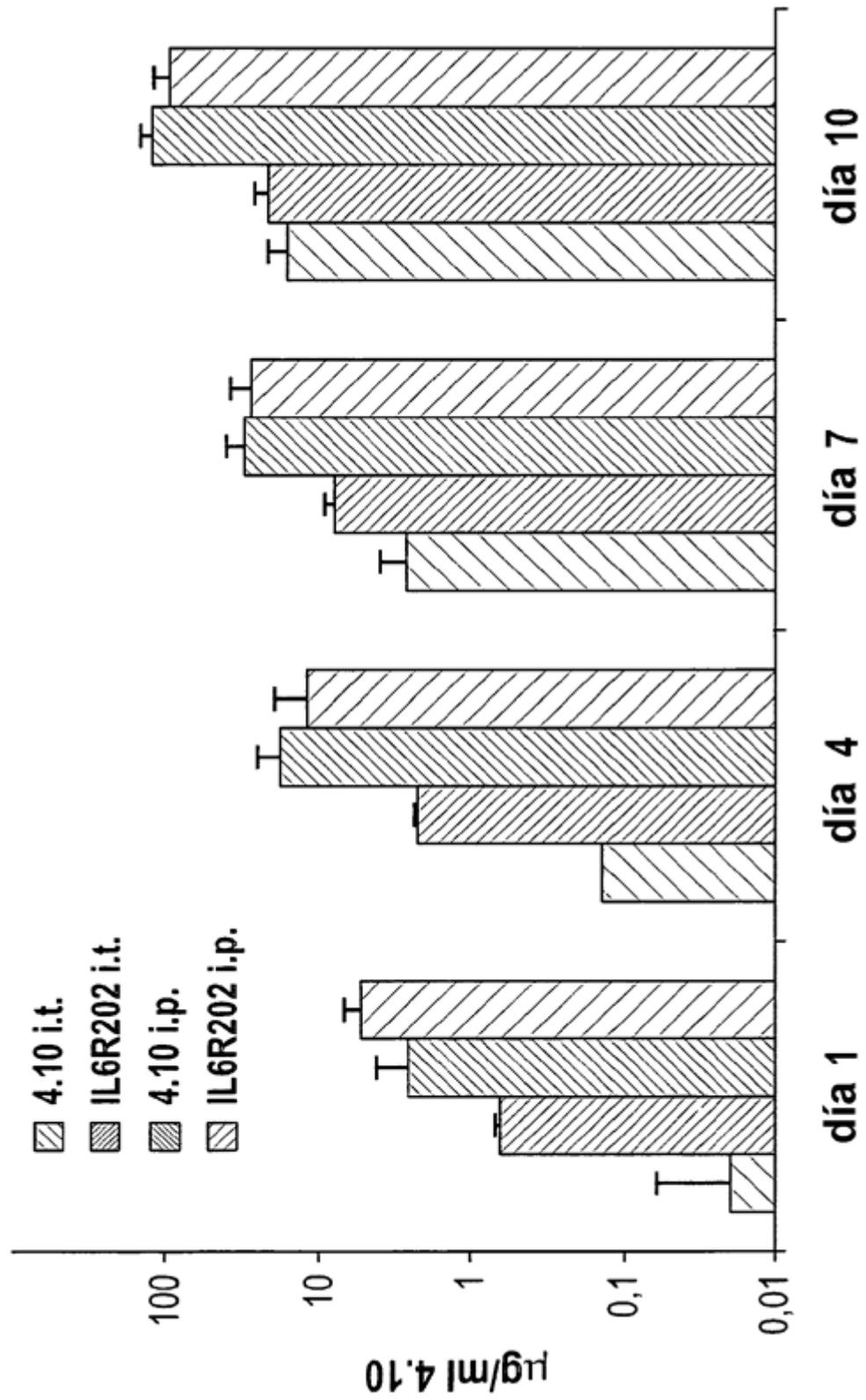


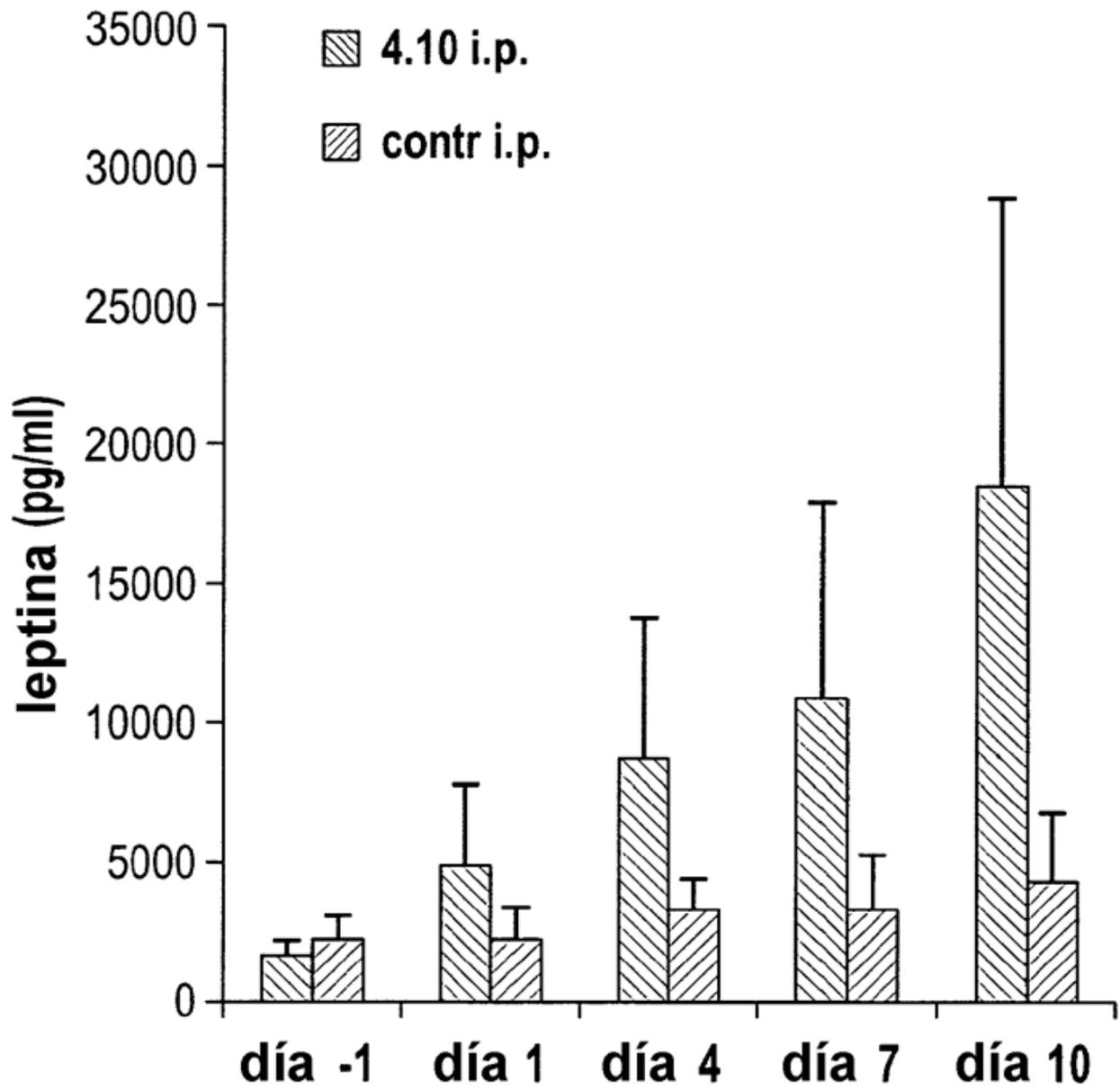
Figura 23b:

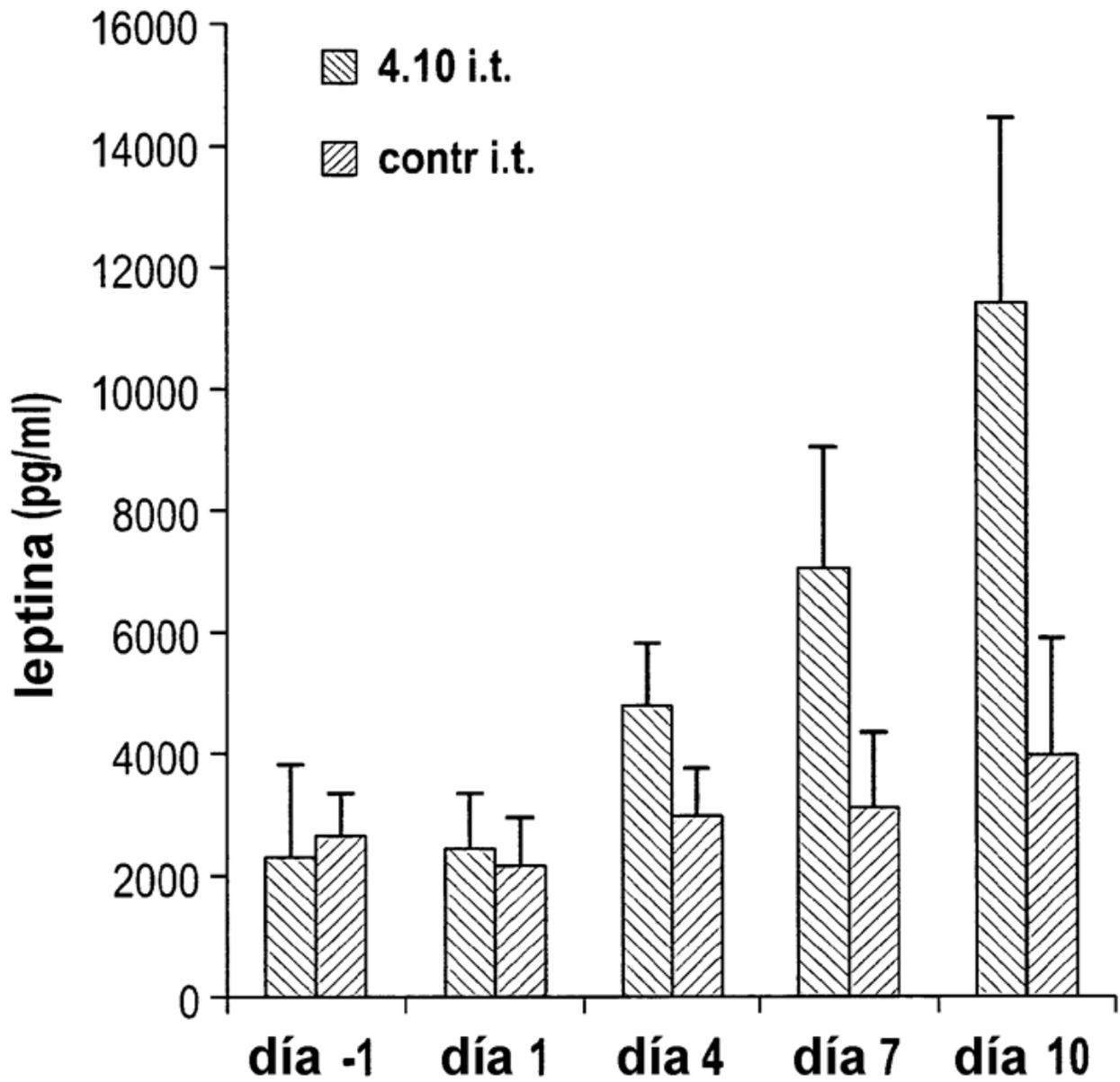
Figura 23c:

Figura 24a:

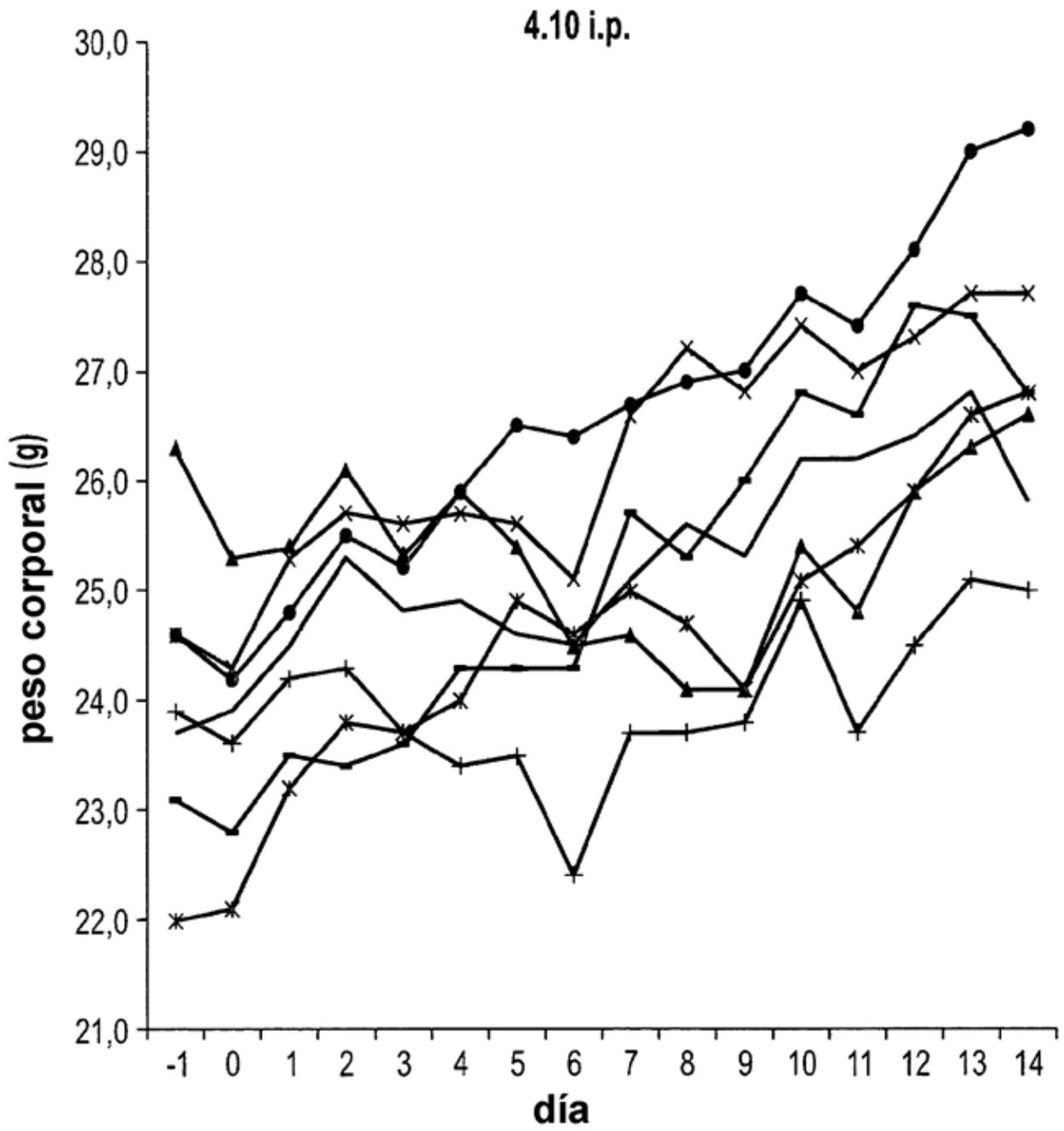


Figura 24b:

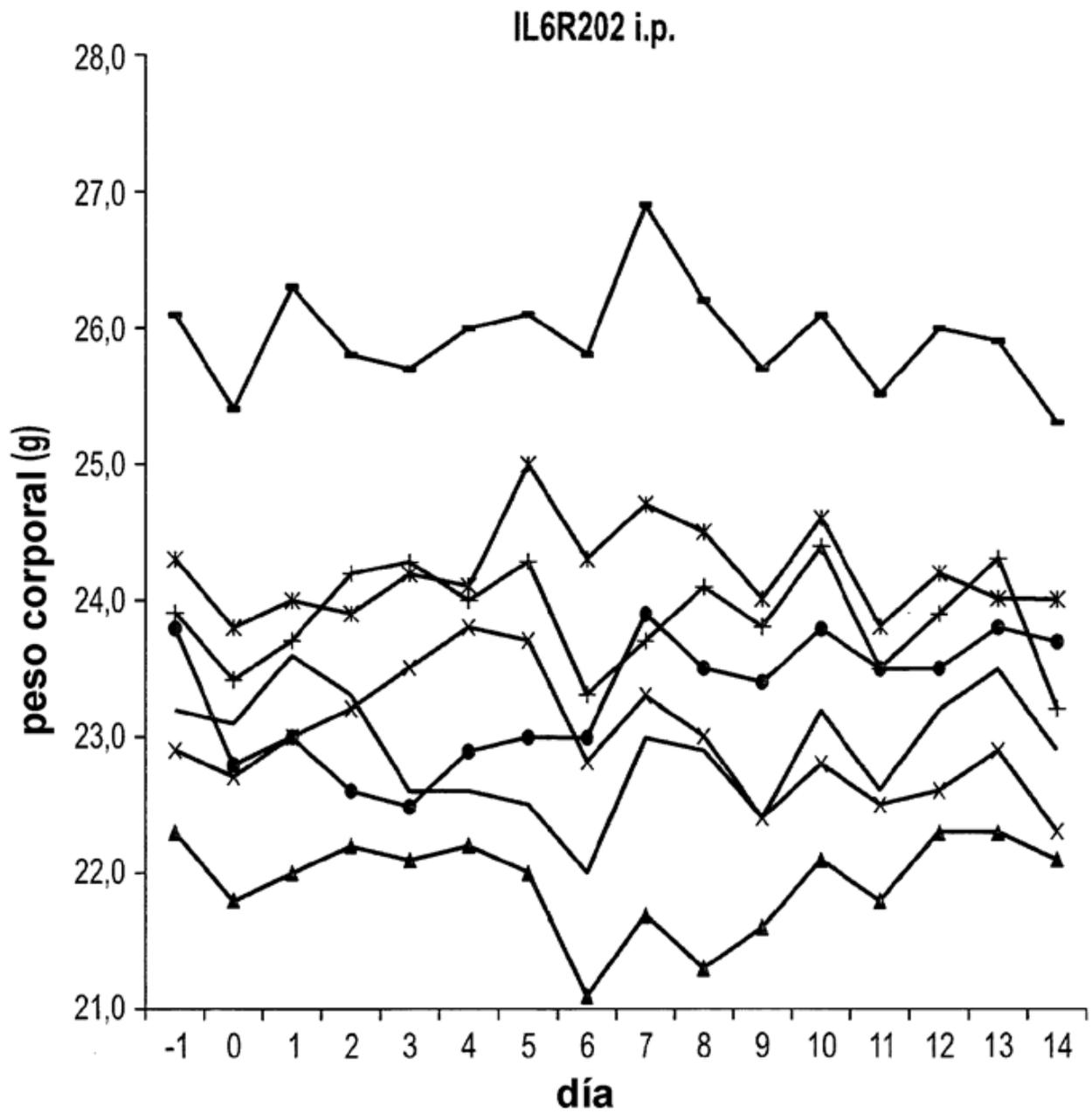


Figura 24c:

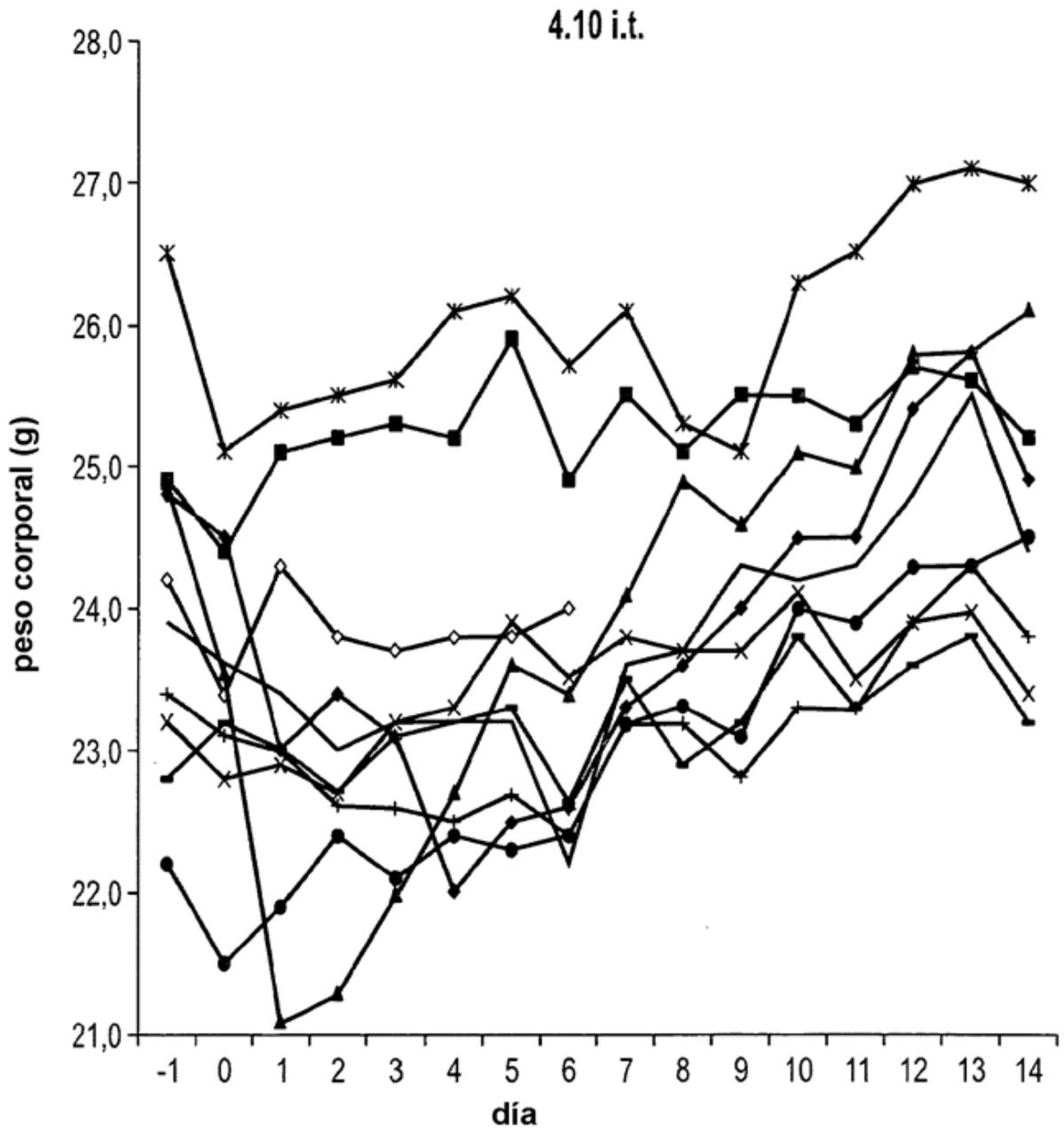


Figura 24d:

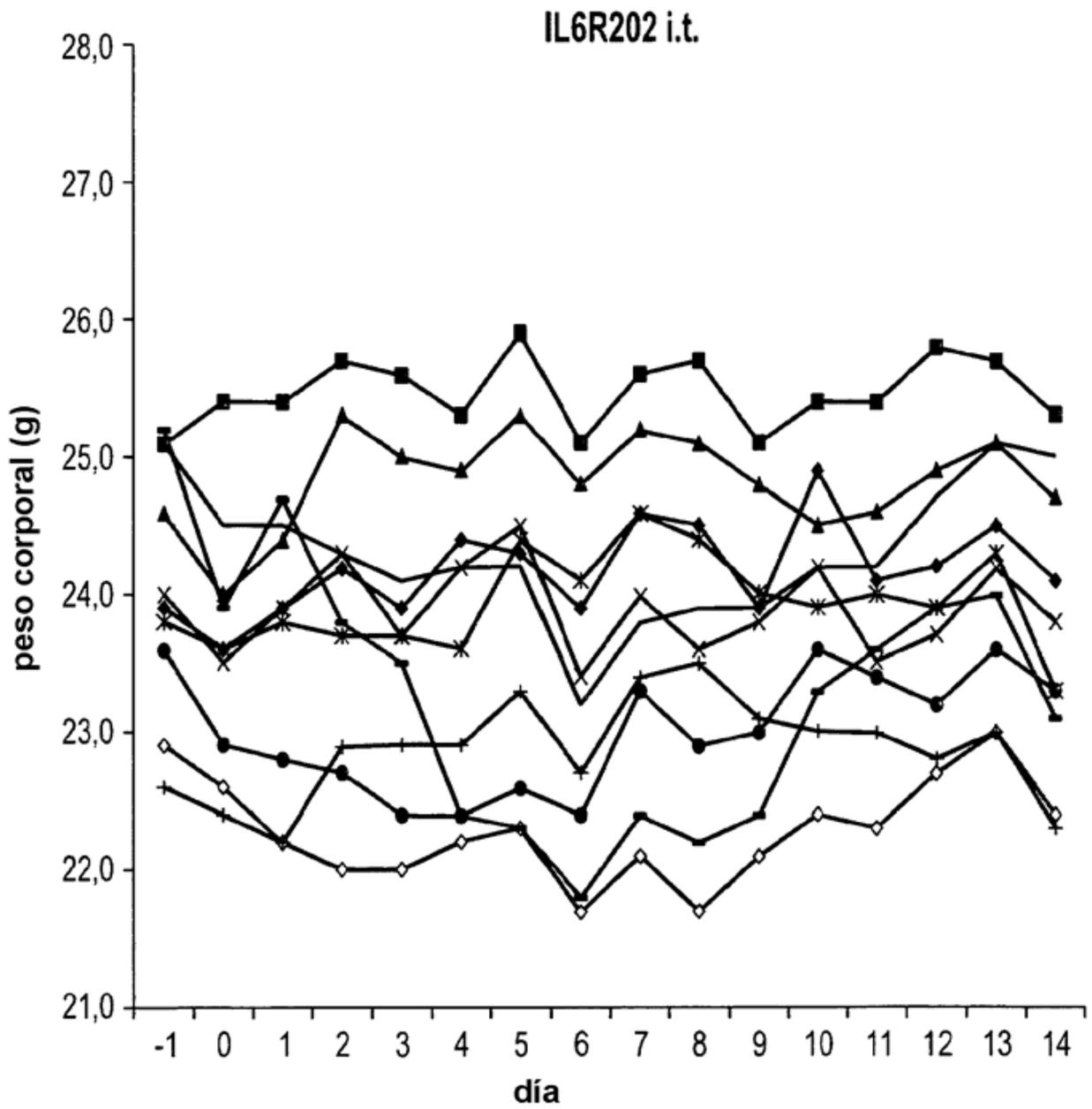


Figura 24e:

Residuales escalados para el peso corporal

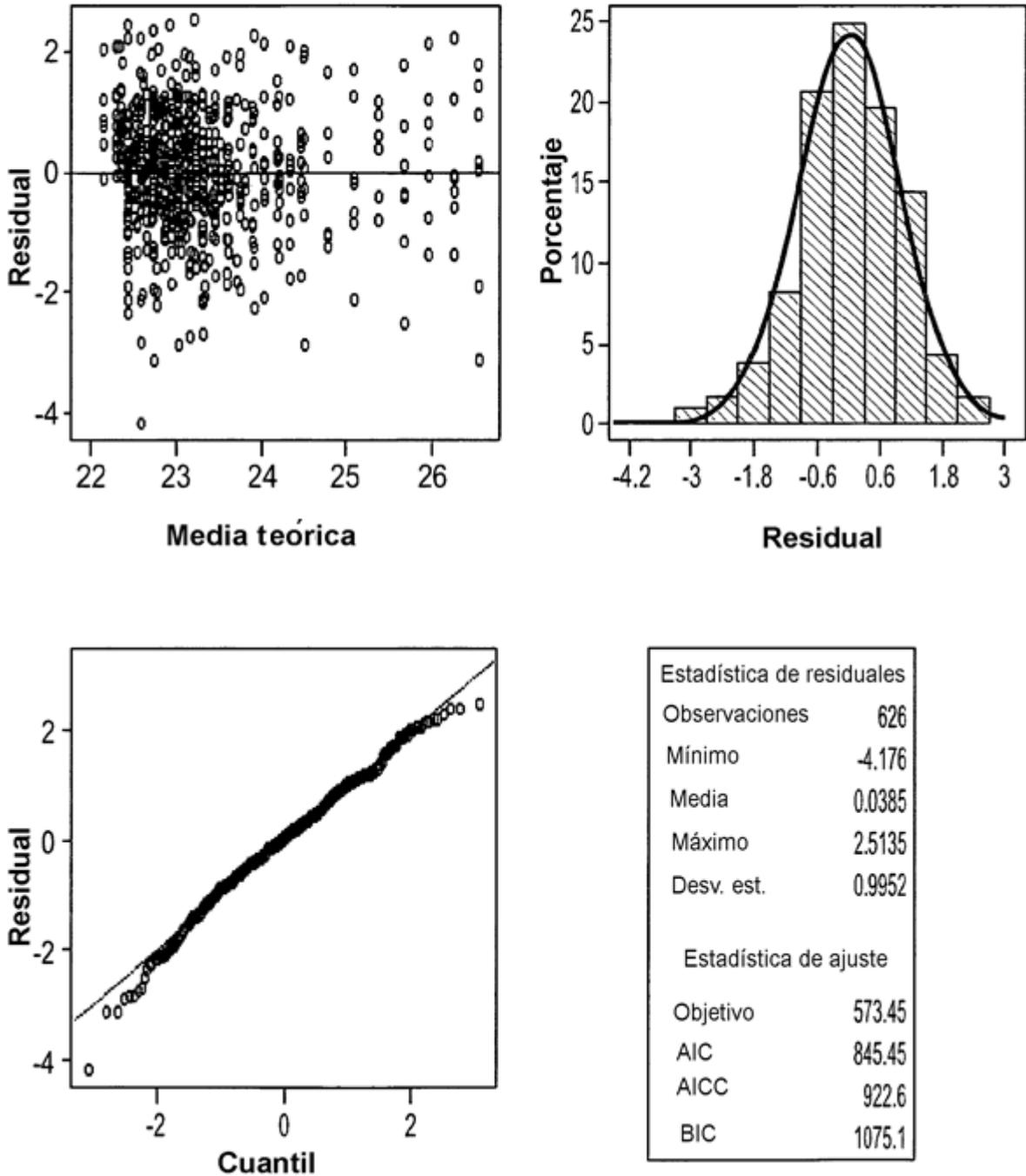


Figura 24f:

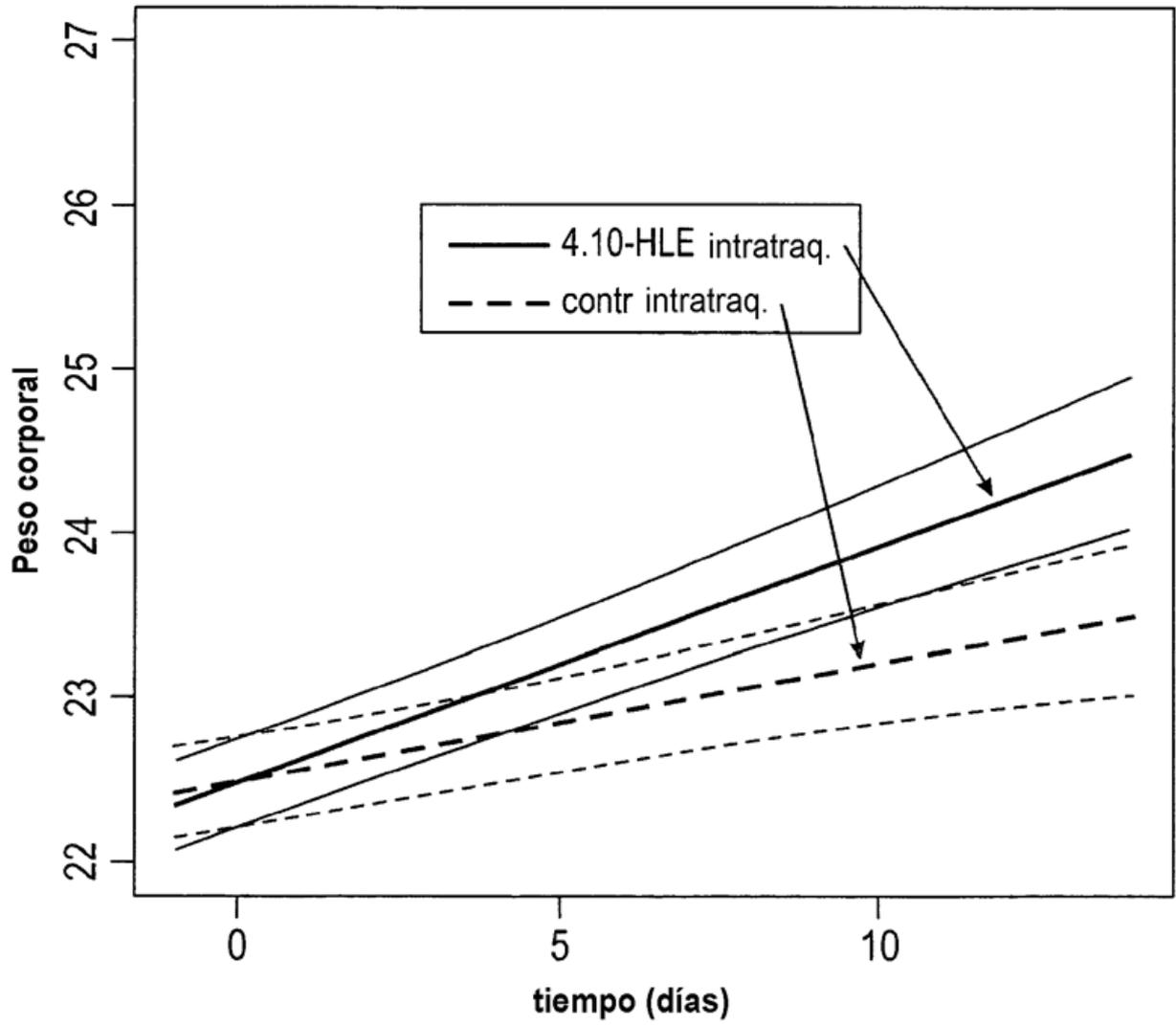


Figura 24g:

