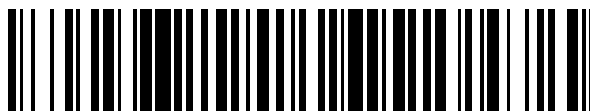


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 320**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2009** **PCT/EP2009/067687**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010** **WO10070145**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009** **E 09799348 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019** **EP 2370465**

54 Título: **Inmunización genética para producir inmunoglobulinas contra antígenos asociados a células tales como P2X7, CXCR7 o CXCR4**

30 Prioridad:

19.12.2008 US 203188 P

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

31.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LAEREMANS, TOON;
STORTELEERS, CATELIJNE;
NOLTE, FRIEDRICH;
GONZALEZ, MARIA;
ASSUNCAO, JOANA y
VAN ROMPAEY, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 729 320 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

Inmunización genética para producir inmunoglobulinas contra antígenos asociados a células tales como P2X7, CXCR7 o CXCR4

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para generar secuencias de inmunoglobulina contra GPCR o canales iónicos según la reivindicación 1.

Los antígenos asociados a células, más específicamente aquellos con dominios transmembrana individuales o múltiples, son difíciles de purificar en su conformación nativa. Para identificar anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos tales como Nanobodies) contra epítomos nativos que pueden modificar la función de la diana *in vivo*, es crucial administrar el antígeno diana en su conformación nativa al camélido [Dormitz *et al.* (2008). Trends in Biotechnology 26: 659-667.]. En ausencia de proteína nativa purificada de estos antígenos asociados a células, la estrategia de inmunización más aplicada consiste en inyecciones repetitivas de células completas que expresan funcionalmente el antígeno de elección a intervalos regulares. Ejemplos de dianas para las cuales dicha estrategia de inmunización se ha ejecutado con éxito (es decir, que da como resultado la identificación de Nanobodies neutralizantes madurados *in vivo*) se describen en los documentos WO 05/044858 y WO 07/042289). Sin embargo, las inyecciones repetidas de refuerzo de las células que expresan la diana a menudo dan como resultado respuestas inmunitarias específicas de la diana diluidas o no detectables, especialmente cuando el nivel de expresión de la diana es bajo y el fondo de la célula huésped es altamente inmunogénico. La respuesta humoral puede enfocarse más hacia la diana mediante el uso de una línea celular de origen camélido, que es menos inmunogénica que la de llama. Sin embargo, las inyecciones repetidas de marcadores (casi) auto-superficiales también dan como resultado una respuesta contra los marcadores de superficie de la línea celular de camélidos.

La identificación de anticuerpos selectivos (neutralizantes) contra GPCR, canales iónicos o cualquier otro tipo de marcador de superficie celular de múltiple atravesamiento es complicada [Michel *et al.* (2009). Naunyn-Schmied Archives Pharmacology 379:385-388], ya que i) con mayor frecuencia no hay proteína nativa disponible para inmunización o posterior identificación de anticuerpo, ii) los elementos de múltiple atravesamiento muestran a menudo baja inmunogenicidad (debido a un número limitado de residuos de aminoácido expuestos en superficie extracelular en comparación con la mayoría de receptores transmembrana individuales) y iii) moléculas de superficie de múltiple atravesamiento se expresan a menudo a bajas densidades.

Antecedentes tecnológicos

Se usan ampliamente secuencias de inmunoglobulina, tales como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de los mismos para seleccionar como diana específicamente sus antígenos respectivos en aplicaciones de investigación y terapéuticas. Normalmente, la generación de anticuerpos implica la inmunización de animales experimentales, fusión de células que producen anticuerpos para crear hibridomas y examinar las especificidades deseadas. Alternativamente, pueden generarse anticuerpos examinando bibliotecas sintéticas o no expuestas previamente, por ejemplo, mediante presentación de fago.

La generación de secuencias de inmunoglobulina, tales como Nanobodies, se ha descrito extensamente en diversas publicaciones, entre las que pueden ejemplificarse el documento WO 94/04678, Hamers-Casterman *et al.* 1993 y Muldermans *et al.* 2001. En estos métodos, los camélidos se inmunizan con el antígeno diana con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno diana. El repertorio de Nanobodies obtenido de dicha inmunización se examina además para Nanobodies que se unen al antígeno diana.

En estos casos, la generación de anticuerpos requiere antígeno purificado para inmunización y/o examen. Los antígenos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, o en el transcurso de producción recombinante.

Una clase importante de dianas terapéuticas potenciales son antígenos asociados a células, incluyendo antígenos transmembrana, en particular antígenos transmembrana con múltiples dominios que atraviesan la membrana. Los antígenos asociados a células, y especialmente los unidos a membranas, sin embargo, son difíciles de obtener en su conformación natural porque están incrustados dentro, o anclados en la membrana celular. Con el propósito de obtener secuencias de inmunoglobulina contra epítomos presentes en la conformación natural, es decir epítomos conformacionales, que están presentes *in vivo*, es sin embargo esencial inmunizar con el antígeno diana en la conformación correcta. Tales epítomos conformacionales son de suma importancia para crear secuencias de inmunoglobulina farmacéuticamente activas. Por ejemplo, una secuencia de inmunoglobulina que interactúa específicamente con la región de poro de un canal iónico afectará a su conductividad, y por tanto proporcionará un efecto farmacológico.

Puede realizarse inmunización y/o examen de secuencias de inmunoglobulina usando fragmentos de péptido de tales antígenos. Sin embargo, tal enfoque no proporcionará anticuerpos a epítomos dependientes de la conformación, ya que tales epítomos no pueden reproducirse por péptidos sintéticos cortos.

Por tanto, para estos antígenos asociados a células, la inmunización con células completas que portan el antígeno y posterior examen del repertorio de Nanobodies inducidos de esta manera para Nanobodies que se unen al antígeno asociado a células es una opción (tal como se realizó, por ejemplo, en los documentos WO 2005/044858; WO 2007/042289; WO 2008/074839; WO 2009/068625; WO 2009/138519). Sin embargo, tales células expresan una multitud de antígenos, lo que da como resultado una respuesta de anticuerpo que se dirige en gran medida a antígenos sin interés. Por tanto, la respuesta de anticuerpo que puede obtenerse mediante este enfoque se caracteriza por una baja especificidad, y en particular por una frecuencia muy baja de los anticuerpos de interés entre todos los anticuerpos generados. Por tanto, este enfoque excluye la generación eficaz de anticuerpos contra el antígeno diana de interés.

Koch-Nolte *et al.* (2007 FASEB J. 21:3490-3498) describen anticuerpos de dominio individual de llama que bloquean de manera eficaz y específica ecto-ADP-ribosiltransferasa de células T ART2.2 *in vivo*. ART2.2 es una enzima de superficie de células T asociada a balsas lipídicas, anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), pero no un antígeno transmembrana.

Chowdhury (2003 Methods in Molecular Biology 207:57-62) se refiere a inmunización con ADN como medio para generar anticuerpos contra proteínas, pero reconoce que aumentar los anticuerpos contra proteínas nativas y especialmente proteínas de membrana todavía no es una tarea fácil. Para superar esto, Chowdhury sugiere el uso de la inmunización basada en ADN para producir anticuerpos, pero no divulga ni insinúa un método de sensibilización y refuerzo.

El documento WO2004/090097 a nombre de Bristol-Myers Squibb Co. se refiere a un polinucleótido que codifica para una variante de corte y empalme de P2X7 humana, HBMYP2X7V. Ejemplos hipotéticos describen la generación de anticuerpos convencionales o fragmentos de los mismos contra HBMYP2X7V.

Por tanto, la técnica no proporciona un método satisfactorio para generar respuestas de anticuerpo específicas de amplitud adecuada contra epítomos conformacionales, en particular de antígenos asociados a membrana.

Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención es superar estos inconvenientes de la técnica. En particular, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para crear secuencias de inmunoglobulina contra antígenos complejos, tal como antígenos asociados a células que presentan epítomos conformacionales.

Los problemas mencionados anteriormente se superan mediante la presente invención. Se ha encontrado que la vacunación genética puede dar como resultado una respuesta de anticuerpo de buena especificidad y amplitud aceptable contra epítomos conformacionales, es decir, contra antígenos asociados a células en su conformación natural.

La presente invención se realiza en las reivindicaciones adjuntas. También se divulga lo siguiente: un método para la generación de secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por un antígeno asociado a células que comprende las etapas de:

a) vacunación genética de un animal no humano con un ácido nucleico que codifica para dicho antígeno asociado a células o un dominio o parte específica de dicho antígeno asociado a células; y

b) opcionalmente refuerzo del animal con dicho antígeno en su conformación natural seleccionado de 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 antígeno enriquecido, liposomas, o partículas de virus que expresan el antígeno asociado a células

c) examen de un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina derivadas de dicho animal no humano para secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por dicho antígeno asociado a células. En una realización particular de la invención, dicho antígeno asociado a células se selecciona de antígenos transmembrana, antígenos transmembrana con múltiples dominios de atravesamiento, tales como GPCR o canales iónicos. Según la invención dicho animal no humano es un camélido, preferiblemente camélidos y llama.

Según la invención, las secuencias de inmunoglobulina son secuencias de V_{HH}.

Según la invención, la vacunación puede realizarse mediante una inyección de chorro sin aguja, mediante un método balístico, mediante inyecciones mediadas por aguja tales como tatuaje, mediante aplicación tópica del ADN sobre la piel en parches o mediante cualquiera de estos métodos de administración seguido por electroporación *in vivo*, y además incluye vacunación realizada mediante administración intradérmica, intramuscular o subcutánea de ADN.

El conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina puede obtenerse de la sangre de dicho mamífero no humano.

En la presente invención, dicho antígeno asociado a células es un GPCR o canal iónico y puede expresarse en cualquier fondo celular que permite la expresión de la conformación nativa del antígeno. Ejemplos de tales fondos celulares son Cho, Cos7, Hek293, o células de origen camélido. Preferiblemente, dicho antígeno asociado a células es un antígeno que atraviesa la membrana, incluyendo pero sin limitarse a un antígeno seleccionado de CXCR7, CXCR4 y P2X7.

El conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina puede expresarse en un conjunto, colección o muestra de células o virus y dicho conjunto, colección o muestra de células o virus se examina para células o virus que expresan una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno asociado a células, más específicamente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno asociado a células puede purificarse y/o aislarse de la célula o virus, seguido por expresión de dicha secuencia de inmunoglobulina.

Según la invención, el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina puede codificarse por un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico y dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico se examina para secuencias de ácido nucleico que codifican para una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno asociado a células; más específicamente, las secuencias de ácido nucleico que codifican para una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno asociado a células puede purificarse y/o aislarse, seguido por expresión de dicha secuencia de inmunoglobulina.

Según la invención, la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno asociado a células puede purificarse y/o aislarse.

La divulgación también se refiere a inmunoglobulina que puede obtenerse mediante un método tal como se describe en el presente documento, y composiciones que comprenden dichas secuencias de inmunoglobulina que se dirigen contra (tal como se define en el presente documento) canales iónicos y GPCR.

En particular, la presente divulgación se refiere a secuencias de inmunoglobulina que se dirigen contra (tal como se define en el presente documento) canales iónicos, así como a compuestos o constructos, y en particular proteínas y polipéptidos, que comprenden o consisten esencialmente en una o más de tales secuencias de inmunoglobulina (también denominadas en el presente documento "secuencias de inmunoglobulina de la divulgación", "compuestos de la divulgación" y "polipéptidos de la divulgación", respectivamente). La divulgación también se refiere a ácidos nucleicos que codifican para tales secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos (también denominados en el presente documento como "ácidos nucleicos de la divulgación" o "secuencias de nucleótidos de la divulgación"); a métodos para preparar tales secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos; a células huésped que expresan o son capaces de expresar tales secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales secuencias de inmunoglobulina, polipéptidos, ácidos nucleicos y/o células huésped; y a usos de tales secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y/o composiciones, en particular con propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, tales como los propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico mencionados en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Cinética de la respuesta inmunitaria humoral en llama tras vacunación genética con Pig-jet (panel A) o método de tatuaje (panel B).

Figura 2. Efecto de refuerzo proteico HBSAg individual en llamas vacunadas con ADN. Leyenda de gráficos como en la figura 1.

Figura 3. Respuestas inmunitarias humorales obtenidas por medio de protocolo de refuerzo de "proteína" - sensibilización de "ADN" (llamas 124, 160, 117, 203) frente a inmunizaciones proteicas (llamas 32 y 33).

Figura 4. Respuesta de anticuerpo mediada por anticuerpo de cadena pesada (IgG2 y 3) contra HBSAg.

Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca el objeto de las reivindicaciones adjuntas.

A) Definiciones

A menos que se indique o se defina lo contrario, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, lo que será evidente para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory

Press (1989); F. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing 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", 2ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6ª ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt *et al.*, Roitt's Essential Immunology, 10ª ed. Blackwell Publishing, RU (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica anterior general citada en el presente documento;

A menos que se indique lo contrario, el término "secuencia de inmunoglobulina", ya se use en el presente documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, se usa como término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluyendo pero sin limitarse a dominios de unión a antígeno o fragmentos tales como dominios de V_{HH} o dominio de V_H/V_L , respectivamente). Los términos moléculas de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno se usan indistintamente con secuencia de inmunoglobulina, e incluyen Nanobodies.

Según la invención, las secuencias de inmunoglobulina son secuencias de V_{HH} .

En lo siguiente, el término nanobody o nanobodies se refiere a secuencia(s) de V_{HH} como una realización de la invención.

Las secuencias de inmunoglobulina proporcionadas por la divulgación están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de una proteína o polipéptido de la divulgación (tal como se define en el presente documento), que pueden comprender o consistir esencialmente en una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación y que pueden comprender además opcionalmente una o más secuencias adicionales de inmunoglobulina (todas unidas opcionalmente por medio de uno o más ligadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, la una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación pueden usarse como unidad de unión en una proteína o polipéptido de este tipo, que puede contener opcionalmente una o más secuencias adicionales de inmunoglobulina que pueden servir como unidad de unión (es decir, contra una o más de otras dianas que antígenos asociados a células), para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico de la divulgación, respectivamente, tal como se describe en el presente documento. Una proteína o polipéptido de este tipo también puede estar en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento).

La divulgación incluye secuencias de inmunoglobulina de camélido. La divulgación también incluye secuencias de inmunoglobulina humanizadas o quiméricas. La divulgación comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas tal como se describe por Ward *et al.* (véase, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). Además, la divulgación comprende secuencias de inmunoglobulina fusionadas, por ejemplo, que forman un constructo multivalente y/o multiespecífico (para polipéptidos multivalente y multiespecíficos que contienen uno o más dominios de V_{HH} y su preparación, también se hace referencia 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 secuencias de inmunoglobulina que comprenden etiquetas u otros restos funcionales, por ejemplo, toxinas, marcadores, radioquímicos, etc., que pueden derivar de las secuencias de inmunoglobulina de la presente divulgación.

La secuencia de inmunoglobulina y estructura de una secuencia de inmunoglobulina, en particular un Nanobody puede considerarse, sin embargo, sin limitarse al mismo, que está comprendida por cuatro regiones de entramado o "FR", a las que se hace referencia en la técnica y en el presente documento como "región de entramado 1" o "FR1"; como "región de entramado 2" o "FR2"; como "región de entramado 3" o "FR3"; y como "región de entramado 4" o "FR4", respectivamente; cuyas regiones de entramado están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", a las que se hace referencia en la técnica como "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; como "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y como "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 112-115, y es lo más preferiblemente 113. Debe indicarse, sin embargo, que partes, fragmentos, análogos o derivados (tal como se describe además en el presente documento) de un Nanobody no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que dichas partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan con los requisitos adicionales descritos en este documento y también sean preferiblemente adecuados para los propósitos descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencias de inmunoglobulina" se refiere a tanto las secuencias de ácido nucleico que codifican para una molécula de inmunoglobulina, como el polipéptido de inmunoglobulina *per se*. Cualquier significado más limitativo será evidente a partir del contexto particular.

Todas estas moléculas también se denominan "polipéptido de la divulgación", que es sinónimo de "secuencias de

inmunoglobulina” de la divulgación.

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

En lo siguiente, la referencia a una “molécula de ácido nucleico” de la divulgación puede referirse o bien al ácido nucleico para vacunación genética, o bien al ácido nucleico que codifica para las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación, o ambos, tal como será evidente a partir del contexto específico.

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

La invención se refiere a un método para la generación de secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a un antígeno tal como se define en la reivindicación 1. En el contexto de la presente invención, “unión a” un determinado antígeno tiene el significado habitual en la técnica tal como se entiende, por ejemplo, en el contexto de anticuerpos y sus antígenos respectivos.

En realizaciones particulares de la invención, el término “se une a” significa que la secuencia de inmunoglobulina interactúa específicamente con un antígeno, y se usa indistintamente con secuencias de inmunoglobulina “contra” dicho antígeno.

El término “especificidad” se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos a las que puede unirse una secuencia de inmunoglobulina particular, molécula de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno (tal como un Nanobody o un polipéptido de la divulgación). 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 para la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor sea el valor de la K_D , más fuerte será la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión a antígeno (alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$). Tal como será evidente para el experto (por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en el presente documento), la afinidad puede determinarse de manera conocida *per se*, según el antígeno específico de interés. La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un Nanobody o polipéptido de la divulgación) y el antígeno pertinente. Avidéz se refiere tanto a la afinidad entre un determinante antigénico como a su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno y el número de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión a antígeno.

Normalmente, las secuencias de inmunoglobulina de la presente divulgación (tal como las secuencias de inmunoglobulina, Nanobodies y/o polipéptidos de la divulgación) 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} litro/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litro/moles), y/o unirse a antígenos asociados a células tal como se define en el presente documento con una velocidad k_{on} de entre $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y/o unirse a antígenos asociados a células tal como se define en el presente documento con una velocidad k_{off} entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ 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 $10^{-4} \text{ mol/litro}$ (o cualquier valor de K_A menor de 10^4 M^{-1}) litros/mol se considera generalmente que indica unión inespecífica.

Preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina monovalente de la divulgación 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 de enzimas (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 será evidente para el experto. Los métodos para determinar la constante de disociación serán evidentes para el experto, y por ejemplo incluyen las técnicas mencionadas en el presente documento. A este respecto, también será evidente que puede no ser posible medir las 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 será también evidente para el experto, la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse basándose en la constante de asociación (real o aparente) (K_A), por medio de la relación $[K_D = 1/K_A]$.

La afinidad denota la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se proporciona comúnmente por 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 una secuencia de inmunoglobulina, secuencia de inmunoglobulina, Nanobody o polipéptido de la divulgación y su diana prevista) se expresará principalmente en cuanto al valor de K_D de su interacción; siendo claro para el experto que en vista de la relación $K_A = 1/K_D$, especificando la fuerza de interacción molecular por 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 (DG) de unión mediante la relación bien conocida $\text{DG} = \text{RT} \cdot \ln(K_D)$ (de manera equivalente $\text{DG} = -\text{RT} \cdot \ln(K_A)$), en donde R es igual a la constante de los gases, T es igual a la temperatura absoluta y ln denota el logaritmo neperiano.

La K_D para interacciones biológicas, tales como la unión de las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación al antígeno asociado a células tal como se define en el presente documento, que se consideran significativas (por ejemplo, específicas) están normalmente en el intervalo de 10^{-10} M (0,1 nM) a 10^{-5} M (10000 nM). Cuanto más fuerte sea una interacción, menor será su K_D .

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

En cuanto a las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación, la velocidad de asociación puede variar entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, aproximándose a la constante de velocidad de asociación limitada por difusión para interacciones biomoleculares. La velocidad de disociación está relacionada con la semivida de una interacción molecular dada por la relación $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$. La velocidad de disociación de secuencias de inmunoglobulina de la divulgación puede variar entre 10^{-6} s^{-1} (complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días) a 1 s^{-1} ($t_{1/2} = 0,69 \text{ s}$).

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

También será evidente para el experto que la K_D medida puede corresponderse con la K_D aparente si el proceso de medición influye de algún modo en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo, mediante artefactos relacionados con el recubrimiento sobre el biosensor 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 aidez de la interacción por las dos moléculas.

Otro enfoque que puede usarse para evaluar la afinidad es el procedimiento ELISA de 2 etapas (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) de Friguet *et al.* (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985). Este método establece una medición de 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 exacta de K_D puede ser bastante laboriosa y como consecuencia, a menudo se determinan 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 manera uniforme (por ejemplo, manteniendo las condiciones de ensayo inalteradas), pueden usarse mediciones de K_D aparente como aproximación de la K_D verdadera 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 juzgar si es conveniente determinar la afinidad de unión relativa a alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la fuerza de unión entre moléculas A y B, puede usarse, por ejemplo, una molécula de referencia C que se sabe que se une a B y que se marca de manera adecuada con un grupo cromóforo o fluoróforo u otro resto químico, tal como biotina para la fácil detección en un ELISA o FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) u otro formato (el fluoróforo para detección de fluorescencia, el cromóforo para detección de absorción de luz, la biotina para detección 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 cantidad o concentración 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 se reduce a la mitad. Siempre que se conozca $K_{D \text{ ref}}$, la K_D de la molécula de referencia, así como la concentración total c_{ref} de la molécula de referencia, la K_D aparente para la interacción A-B puede obtenerse a partir de la siguiente fórmula: $K_D = CI_{50}(1 + c_{\text{ref}}/K_{D \text{ ref}})$. Obsérvese que si $c_{\text{ref}} \ll K_{D \text{ ref}}$, $K_D \approx CI_{50}$. Siempre que la medición de la CI_{50} se realice de manera uniforme (por ejemplo, manteniendo la c_{ref} fija) para los aglutinantes que se comparan, la fuerza o estabilidad de una interacción molecular puede evaluarse mediante la CI_{50} y esta medición se juzga como equivalente a K_D o a K_D aparente en la totalidad de este texto.

En el contexto de la presente invención, "epítipo dependiente de la conformación" o "epítipo conformacional" denota un epítipo que comprende aminoácidos que no están dentro de un único tramo consecutivo de la secuencia primaria del antígeno. En otras palabras, debido a la estructura secundaria y/o terciaria de una proteína diana, los aminoácidos que pueden estar separados en la secuencia primaria se acercan entre sí y de ese modo, participan en la formación de un epítipo. Si, por ejemplo, un antígeno comprende tres bucles de aminoácido, los residuos en cada uno de estos bucles pueden participar en la formación de un único epítipo. Lo mismo se aplica a antígenos que comprenden más de un dominio o subunidad. En este caso, un epítipo puede formarse por aminoácidos en diferentes dominios o subunidades. La desnaturalización completa o parcial de la proteína mediante condiciones apropiadas, es decir, la destrucción parcial o completa de estructuras secundarias y/o terciarias, también destruirá parcial o completamente epítipos conformacionales. El experto entenderá que las condiciones precisas en las que un epítipo conformacional se destruye desnaturalizando una proteína dependerán de la naturaleza de la proteína y las circunstancias específicas.

En una realización preferida, la presente divulgación se refiere a secuencias de inmunoglobulina contra epítipos conformacionales. En particular, la divulgación se refiere a secuencias de inmunoglobulina contra epítipos conformacionales sobre antígenos asociados a células tal como se define en el presente documento, que son secuencias de inmunoglobulina de camélido, incluyendo Nanobodies.

En el contexto de la presente divulgación, "antígeno asociado a células" significa antígenos que se anclan firmemente en o se ubican dentro de las membranas de una célula (incluyendo membranas de compartimentos y orgánulos subcelulares), e incluye antígenos que tienen una única o múltiples regiones transmembrana. En otras palabras, el término se refiere a antígenos que presentan epítipos conformacionales dependientes de membrana. En particular, el término se refiere a antígenos que tienen epítipos conformacionales tal como se define en el presente documento. En la presente invención "antígeno asociado a células" se refiere a GPCR o canales iónicos. Entre todos estos antígenos, el experto conoce una variedad de antígenos diana farmacoconvertibles, que representan un antígeno asociado a células preferido de la presente invención. La invención en particular se refiere a antígenos asociados a células en los que el epítipo dependiente de la conformación depende del anclaje correcto y/o ubicación en la membrana. Por tanto, la divulgación proporciona secuencias de inmunoglobulina contra tales epítipos dependientes de la conformación.

En una realización preferida, la invención se refiere a antígenos que son proteínas de membrana integrales que tienen uno, o más preferiblemente múltiples dominios que atraviesan la membrana. Estos antígenos residirán en y operarán dentro de una membrana plasmática celular, y/o las membranas de compartimentos y orgánulos subcelulares. Muchas proteínas transmembrana, tales como receptores transmembrana comprenden dos o más subunidades o dominios, que interactúan funcionalmente entre sí.

Las proteínas de membrana integrales comprenden tres partes o dominios distintos, es decir, un dominio extracelular (o extracompartimental), un dominio transmembrana y un dominio intracelular (o intracompartimental). Una proteína que tiene múltiples dominios transmembrana también tendrá normalmente múltiples dominios extracelulares e intracelulares/compartimentales. Por ejemplo, un receptor de siete transmembranas comprenderá siete dominios transmembrana.

Por tanto, el término antígeno asociado a células tal como se entiende en el presente documento se pretende que excluya antígenos que están sólo ligeramente asociados, es decir, que no están firmemente anclados o ubicados dentro de una membrana. Un antígeno está firmemente anclado si comprende al menos un dominio o parte que se extiende a la membrana.

En una realización, la invención excluye antígenos que tienen una inserción de membrana por medio de una cola lipídica, pero sin dominio transmembrana. En este caso, la conformación de la porción o dominio hidrófilo de la proteína no dependerá del entorno de la membrana. Por ejemplo, será posible expresar una proteína recombinante

que carece de la cola lipídica, que está en la conformación adecuada, es decir, expresa los epítomos conformacionales también presentes si el antígeno está asociado con la membrana a través de la cola lipídica. De manera similar, cualquier otra proteína que solo esté asociada ligeramente se excluye de la invención en una realización particular. En este sentido, "asociado ligeramente" significa proteínas que muestran su conformación natural incluso en ausencia de membrana, es decir, su conformación natural no depende del anclaje o incrustación dentro de una membrana. En una realización particular adicional, la invención excluye ART2.2.

Los ejemplos típicos de antígenos asociados a células según la invención comprenden receptores acoplados a proteína G, tales como los descritos adicionalmente en el presente documento, receptor adrenérgico, receptores olfativos, receptor tirosina quinasas, tales como receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor de insulina, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos, receptores de neurotrofina de alta afinidad y receptores Eph, integrinas, receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad, receptor de NMDA, varios receptores inmunitarios, incluyendo el receptor tipo Toll, receptor de células T y CD28. Además, los antígenos asociados a las células según la invención también comprenden canales iónicos, tales como los que se describen en el presente documento, canales de calcio, canales de sodio, canales de potasio, canales iónicos 2P, canales iónicos 6-TM, canales iónicos dependientes de voltaje y/o canales de potasio activados por calcio.

Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno asociado a células" se pretende que incluya, y también se refiera a, cualquier parte, fragmento, subunidad, o dominio de dicho antígeno asociado a células. Cualquier subsección del antígeno asociado a células se encuentra dentro del alcance de la presente invención, siempre que represente un epítomo conformacional de interés. Si por ejemplo, el epítomo de interés se ubica en un sitio de unión de un receptor, o el poro de un canal iónico, cualquier fragmento del antígeno asociado a células capaz de formar dicho epítomo se incluye en la invención. Preferiblemente, esas partes, dominios, fragmentos o subunidades serán aquellas partes del antígeno asociado a células que son responsables de la conformación dependiente de membrana. Si por ejemplo una proteína comprende varios dominios transmembrana, unidos por bucles intracelulares extendidos, se prevé que tales bucles están en parte o totalmente omitidos, sin influir en los epítomos conformacionales extracelulares.

En particular, la presente divulgación se refiere a secuencias de inmunoglobulina dirigidas a antígenos asociados a células en su conformación natural. En el contexto de la presente divulgación, "conformación natural" significa que la proteína presenta su estructura secundaria y/o terciaria, en particular su estructura secundaria y/o terciaria dependiente de la membrana. En otras palabras, la conformación natural describe la proteína en una forma no desnaturalizada, y describe una conformación en la que están presentes los epítomos conformacionales, en particular los epítomos conformacionales dependientes de la membrana. Específicamente, la proteína tendrá la conformación que está presente cuando la proteína está integrada en o firmemente unida a una membrana. Los antígenos pueden obtenerse 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 contenga antígeno, liposomas o partículas de virus que expresen el antígeno asociado a células. En cualquiera de estas realizaciones, el antígeno puede enriquecerse por medios adecuados. Dicho antígeno asociado a células puede expresarse en cualquier célula adecuada que permita la expresión del antígeno en su conformación nativa o natural, que abarca, pero no se limita a, Cho, Cos7, Hek293 o células de origen camélido.

El antígeno asociado a células de la presente invención es preferiblemente una proteína de membrana farmacoconvertible, en particular una proteína de membrana farmacoconvertible que tiene múltiples dominios que atraviesan la membrana y es un GPCR o un canal iónico.

A continuación se proporcionan ejemplos específicos, no limitativos, de canales iónicos que representan antígenos asociados a células según la presente invención. También se enumeran los efectos terapéuticos de las secuencias de inmunoglobulina que reconocen específicamente tales canales iónicos.

1. Canales de potasio de dos P (véase Goldstein *et al.*, Pharmacological Reviews, 57, 4, 527 (2005)), tales como K_{2P}1.1, K_{2P}2.1, K_{2P}3.1, K_{2P}3.1, K_{2P}4.1, K_{2P}5.1, K_{2P}6.1, K_{2P}7.1, K_{2P}9.1, K_{2P}10.1, K_{2P}12.1, K_{2P}13.1, K_{2P}15.1, K_{2P}16.1, K_{2P}17.1 y K_{2P}18.1, que pueden examinarse usando ensayos electrofisiológicos tales como FLIPR o pinzamiento zonal.

2. Canales CatSper (véase Clapham y Garbers, Pharmacological Reviews, 57, 4, 451 (2005)), tales como CatSper-1 y CatSper-2 (ambos involucrados en la fertilidad y la motilidad de los espermatozoides), CatSper-3 y CatSper-4, los cuales pueden examinarse todos usando ensayos electrofisiológicos tales como FLIPR, pinzamiento zonal o técnicas de obtención de imágenes de calcio.

3. Canales de dos poros (véase Clapham y Garbers, Pharmacological Reviews, 57, 4, 451 (2005)), tales como TPC1 y TPC2.

4. Canales dependientes de nucleótidos cíclicos (véase Hofman *et al.*, Pharmacological Reviews, 57, 4, 455 (2005)), tales como CNGA-1, CNGA-2, CNGA-3, CNGA-4A, CNGB1 y CNGB3, que pueden examinarse usando técnicas tales como pinzamiento zonal y obtención de imágenes de calcio.

5. Canales dependientes de nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (véase Hofman <i>et al.</i>, Pharmacological Reviews, 57, 4, 455 (2005)), tales como HCN1, HCN2, HCN3, HCN4 (todos considerados como dianas farmacológicas prometedoras para el desarrollo de fármacos para las arritmias cardíacas y la cardiopatía isquémica), que pueden examinarse usando técnicas tales como la fijación de voltaje.
6. Rectificación interior de los canales de potasio (véase Kubo <i>et al.</i>, Pharmacological Reviews, 57, 4, 509 (2005)), tales como $K_{ir}1.1$, $K_{ir}2.1$, $K_{ir}2.2$, $K_{ir}2.3$, $K_{ir}2.4$, $K_{ir}3.1$, $K_{ir}3.2$, $K_{ir}3.3$, $K_{ir}3.4$, $K_{ir}4.2$, $K_{ir}5.1$, $K_{ir}6.1$ (una diana para agentes antihipertensivos y vasodilatadores coronarios), $K_{ir}6.2$ (la diana de la pentolamina; su subunidad SUR1 es una diana para el tratamiento de la diabetes y el PHHI) y $K_{ir}7.1$ (que es un posible sitio para los efectos secundarios de los bloqueadores de los canales de calcio), que pueden examinarse usando técnicas tales como la fijación de voltaje.
7. Canales de potasio activados por calcio (véase Wei <i>et al.</i>, Pharmacological Reviews, 57, 4, 463 (2005)), tales como -$K_{Ca}1.1$ - abridores de los cuales pueden ser útiles en el tratamiento de accidente cerebrovascular, epilepsia, reactividad excesiva de vejiga, asma, hipertensión, hipermotilidad gástrica y psicosis; -$K_{Ca}2.1$ - moduladores de los cuales pueden ser útiles en el tratamiento de diversas enfermedades tales como distrofia muscular miotónica, dismotilidad gastrointestinal, trastornos de la memoria, epilepsia, narcolepsia e intoxicación por alcohol. Se han propuesto abridores de $K_{Ca}2.2$ para la ataxia cerebelosa; -$K_{Ca}2.2$ - moduladores de los cuales pueden ser útiles en el tratamiento de diversas enfermedades tales como distrofia muscular miotónica, dismotilidad gastrointestinal, trastornos de la memoria, epilepsia, narcolepsia e intoxicación por alcohol. Se han propuesto abridores de $K_{Ca}2.2$ para la ataxia cerebelosa; -$K_{Ca}2.2$ - moduladores de los cuales pueden ser útiles en el tratamiento de diversas enfermedades como distrofia muscular miotónica, dismotilidad gastrointestinal, trastornos de la memoria, epilepsia, narcolepsia, hipertensión e incontinencia urinaria; -$K_{Ca}3.1$ - bloqueadores de los cuales pueden ser útiles en el tratamiento de anemia de células falciformes, diarrea, como inmunosupresores, EAE, prevención de la reestenosis y la angiogénesis, tratamiento de las lesiones cerebrales y reducción del edema cerebral. Se han propuesto abridores de $K_{Ca}3.1$ para el tratamiento de la fibrosis quística y la EPOC; así como $K_{Ca}4.1$, $K_{Ca}4.2$ y $K_{Ca}5.1$; de los cuales todos pueden examinarse usando técnicas electrofisiológicas o técnicas tales como pinzamiento zonal o fijación de voltaje.
8. Canales de potasio (véase Shieh <i>et al.</i>, Pharmacological Reviews, 57, 4, 557 (2005) y Gutman <i>et al.</i>, Pharmacological Reviews, 57, 4, 473 (2005)), incluyendo: - canales de calcio dependientes del voltaje tales como $Kv1.1$, $Kv1.2$, $Kv1.3$, $Kv1.4$, $Kv1.5$, $Kv1.6$ y $Kv1.7$; - canales de calcio dependientes del voltaje y cGMP, tales como $Kv1.10$; - subunidades beta de canales Kv, tales como $Kv\beta 1$, $Kv\beta 2$ y $Kv\beta 3$; - canales tipo <i>Shab</i> tales como $Kv2.1$ y $Kv2.2$; - canales tipo <i>Shaw</i> tales como $Kv3.1$, $Kv3.2$, $Kv3.3$ y $Kv3.4$; - canales tipo <i>Shal</i> tales como $Kv4.1$, $Kv4.2$, $Kv4.3$, $Kv5.1$, $Kv6.1$, $Kv6.2$, $Kv8.1$, $Kv9.1$, $Kv9.2$, $Kv9.3$, $KH1$ y $KH2$; - canales <i>ether-a-go-go</i> tales como EAG, HERG, BEC1 y BEC2; - canales tipo MinK tales como MinK, MiRP1 y MiRP2; - canales de tipo KvLQT tales como $KvLQT1$, $KvLQT2$, $KvLQT3$, $KvLQT4$, $KvLQT5$; - rectificar interiormente los canales de potasio tales como los mencionados anteriormente; - receptores de sulfonilurea tales como los receptores de sulfonilurea 1 y 2; - canales activados por calcio de gran conductancia tales como <i>Slo</i> y las subunidades beta de BK_{Ca};

- canales activados por calcio de pequeña conductancia tales como SK1, SK2 y SK3;
- canales activados por calcio de conductancia intermedia tales como IKCa1;
- canales de potasio de dos poros tales como TWIK1, TREK, TASK, TASK2, TWIK2, TOSS, TRAAK y CTBAK1;

de los cuales todos pueden examinarse usando técnicas electrofisiológicas o técnicas como pinzamiento zonal o fijación de voltaje. Los canales de potasio están implicados en una amplia variedad de enfermedades y trastornos tales como enfermedades cardíacas (como arritmia), enfermedades neuronales, trastornos neuromusculares, enfermedades auditivas y vestibulares, enfermedades renales, enfermedad de Alzheimer y enfermedades metabólicas; y son dianas para compuestos activos en estas enfermedades. Se hace referencia nuevamente a las revisiones de Shieh *et al.* y Gutman *et al.* (y a la técnica anterior adicional citada en las mismas) así como a las referencias adicionales citadas en la presente memoria descriptiva. Las tablas 3 y 4 de la revisión de Shieh también mencionan varios abridores y bloqueadores conocidos, respectivamente, de varios canales de potasio y las indicaciones de la enfermedad para las cuales se han usado/propuesto.

9. Canales de calcio dependientes del voltaje (véase Catterall *et al.*, Pharmacological Reviews, 57, 4, 411 (2005)), tales como:

Ca_v1.2 - moduladores de los cuales son útiles como antagonistas de Ca²⁺;

Ca_v1.3 - moduladores de los cuales se han propuesto para modular la frecuencia cardíaca, como antidepresivos y como fármacos para trastornos de la audición;

Ca_v2.1- moduladores de los cuales se han propuesto como analgésicos para el dolor inflamatorio;

Ca_v2.2 - moduladores de los cuales se han propuesto como analgésicos para el dolor, tal como el dolor inflamatorio, el dolor posquirúrgico, la hiperalgesia térmica, el dolor crónico y la alodinia mecánica;

Ca_v3.2- que se ha propuesto como diana para la epilepsia, la hipertensión y la angina de pecho;

Ca_v3.3 - que se ha propuesto como diana para el tratamiento de las oscilaciones talámicas;

y Ca_v1.1, Ca_v1.4, Ca_v2.3, Ca_v3.1; de los cuales todos pueden examinarse usando técnicas tales como pinzamiento zonal, fijación de voltaje y obtención de imágenes de calcio.

10. Canales de potencial de receptor transitorio (TRP) (véase Clapham *et al.*, Pharmacological Reviews, 57, 4, 427 (2005)) tales como:

canales de TRPC tales como TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 y TRPC7;

canales de TRPV tales como TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 y TRPV6;

canales de TRPM como TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 y TRPM8;

TRPA1;

canales de TRPP tales como PKD1, PKD2L1 y PKD2L2, que están involucrados en la enfermedad renal poliquística;

canales de TRPML tales como mucolipina 1, mucolipina 2 y mucolipina 3; que pueden examinarse usando técnicas tales como pinzamiento zonal y obtención de imágenes de calcio.

11. Canales de sodio dependientes de voltaje (véase Catterall *et al.*, Pharmacological Reviews, 57, 4, 397 (2005)), tales como:

-Na_v1.1, Na_v1.2 y Na_v1.3 - que son una diana para fármacos para la prevención y el tratamiento de la epilepsia y las convulsiones;

-Na_v1.4 - que es una diana para anestésicos locales para el tratamiento de la miotonía;

-Na_v1.5 - que es una diana para fármacos antiarrítmicos;

-Na_v1.6 - que es una diana para fármacos antiepilépticos y analgésicos;

-Na_v1.7, Na_v1.8 y Na_v1.9 – que son posibles dianas para anestésicos locales;

de los cuales todos pueden examinarse usando fijación de voltaje o técnicas que involucran tintes sensibles al voltaje.

Los canales iónicos y las enfermedades y trastornos a los que están asociados se conocen bien en la técnica. Se hace referencia, por ejemplo, a las siguientes revisiones: Goldstein *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 527 (2005); Yu *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 387 (2005); Clapham y Garbers, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 451 (2005); Hoffmann *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 455 (2005); Kubo *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 509 (2005); Wei *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 463 (2005); Shieh *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 557 (2005); Catterall *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 411 (2005); Gutman *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 473 (2005); Clapham *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 427 (2005); y Catterall *et al.*, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 397 (2005); así como las referencias adicionales citadas en estas revisiones y los siguientes artículos y revisiones: Chandy *et al.*, *Trends in Pharmacological Sciences*, mayo de 2004, 280-289; Takana y Shigenobu, *J. Pharmacol. Sci.*, 99, 214-200 (2005); Padinjat y Andrews, *Journal of Cell Science*, 117, 5707-5709 (2004); Amir *et al.*, *The Journal of Pain*, vol. 7, n.º 5, S1-S29 (2006); Devor, *The Journal of Pain*, vol. 7, n.º 15, S3-S12 (2006); Xie *et al.*, *Current Drug Discovery*, abril de 2004, 31-33; Vianna-Jorge y Suarez-Kurtz, *BioDrugs* 2004, 18(5), 329-41; Garcia y Kaczorowski, *Sci STKE*, 2005, 302; Gopalakrishnan y Shieh, *Expert Opin. Ther. Targets*, 2005, 8(5), 437-58; Mannhold, *Med. Res. Rev.*, 2004, 24(2), 213-66; Sabido-David *et al.*, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2004, 13(1) 1249-61; y Christ, *Journal of Andrology*, vol. 23, n.º 5, S10-S19 (2002), y a la técnica anterior adicional citada en los mismos así como a la tabla a continuación y la técnica anterior adicional citada en esta solicitud.

Tal como puede observarse a partir de estas revisiones y esta técnica anterior, los canales iónicos se clasifican generalmente basándose en los iones que pueden fluir a través de ellos (es decir, como canales de calcio, canales de sodio o canales de potasio), basándose en su composición y estructura (por ejemplo, el número y tipo de subunidades, poros y dominios transmembrana, por ejemplo canales iónicos 2P, canales iónicos 6-TM, etc.), y/o basándose en la manera en la que se activan (por ejemplo, canales iónicos dependientes del voltaje o canales de potasio activados por calcio).

Los canales iónicos comprenden generalmente varias subunidades de dominio transmembrana, unidas por una combinación de bucles intracelulares y extracelulares. Se hace referencia de nuevo a las referencias y la técnica anterior citadas anteriormente, así como a Benham, *Nature Biotechnology*, octubre de 2005, 1234-1235 y la técnica anterior adicional citada en el presente documento. El hecho de que los canales iónicos son proteínas de membrana, así como su asociación conocida con diversos estados patológicos, hacen que los canales iónicos sean dianas moleculares atractivas para compuestos farmacéuticos y veterinarios (es decir, para profilaxis, terapia o diagnóstico). Además, se conocen bien en la técnica métodos para examinar compuestos farmacéuticos o veterinarios potenciales para actividad (o bien como agonistas, antagonistas, bloqueantes y/o abridores) y/o selectividad con respecto a canales iónicos y su actividad biológica y fisiológica. Algunos ejemplos no limitativos de técnicas adecuadas, según el canal iónico implicado, incluyen técnicas tales como técnicas de pinzamiento zonal, fijación de voltaje, medir el flujo de iones, FLIPR, obtención de imágenes de calcio y electrofisiológicas.

A continuación se proporcionan ejemplos específicos, no limitativos, de GPCR que representan antígenos asociados a células según la presente invención. También se enumeran algunos efectos terapéuticos a modo de ejemplo de las secuencias de inmunoglobulina de la presente divulgación que se dirigen contra estos GPCR.

GPCR de clase A

- Receptor de acetilcolina (agonista),
- Receptor muscarínico (agonista),
- Receptor muscarínico M1 (agonista),
- Receptor muscarínico M2 (agonista),
- Receptor muscarínico M3 (agonista),

- Receptor muscarínico M4 (agonista),
- Receptor muscarínico M5 (agonista)
- 5 – Receptor muscarínico (agonista parcial)
- Adrenoceptor (agonista),
- Adrenoceptor alfa (agonista),
- 10 – Adrenoceptor alfa 1 (agonista),
- Adrenoceptor alfa 1A (agonista),
- 15 – Adrenoceptor alfa 1B (agonista)
- Adrenoceptor alfa 1D (agonista)
- Adrenoceptor alfa 2 (agonista),
- 20 – Adrenoceptor alfa 2A (agonista),
- Adrenoceptor alfa 2B (agonista),
- 25 – Adrenoceptor alfa 2C (agonista),
- Adrenoceptor alfa 2 (agonista parcial)
- Adrenoceptor alfa 3 (agonista),
- 30 – Adrenoceptor beta (agonista),
- Adrenoceptor beta 1 (agonista),
- 35 – Adrenoceptor beta 2 (agonista),
- Adrenoceptor beta 3 (agonista),
- 40 – Receptor de dopamina (agonista),
- Receptor de dopamina D5 (agonista)
- Receptor de dopamina D1 (agonista),
- 45 – Receptor de dopamina D2 (agonista),
- Receptor de dopamina D3 (agonista),
- Receptor de dopamina D4 (agonista),
- 50 – Receptor de histamina (agonista),
- Receptor de histamina H1 (agonista),
- 55 – Receptor de histamina H2 (agonista),
- Receptor de histamina H3 (agonista),
- Receptor de histamina H4 (agonista),
- 60 – 5-HT GPCR (agonista),

- 5
 - 5-HT 1 (agonista),
 - 5-HT 2 (agonista),
 - 5-HT 4 (agonista),
 - 5-HT 5a (agonista),
- 10
 - 5-HT 5b (agonista)
 - 5-HT 6 (agonista),
 - 5-HT 7 (agonista),
- 15
 - Receptor asociado a amina traza (agonista),
 - Receptor 1 asociado a amina traza (agonista),
- 20
 - Receptor 2 asociado a amina traza (agonista)
 - Receptor 3 asociado a amina traza (agonista)
- 25
 - Receptor 4 asociado a amina traza (agonista)
 - Receptor 5 asociado a amina traza (agonista)
 - Receptor 6 asociado a amina traza (agonista)
- 30
 - Receptor 7 asociado a amina traza (agonista)
 - Receptor 8 asociado a amina traza (agonista)
 - Receptor 9 asociado a amina traza (agonista)
- 35
 - Receptor de apelina (agonista),
 - Receptor cannabinoide (agonista),
- 40
 - Receptor cannabinoide CB1 (agonista),
 - Receptor cannabinoide CB2 (agonista),
- 45
 - Receptor de lisoesfingolípidos (agonista),
 - Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (agonista),
 - Receptor de lisofosfatidato-1 (agonista)
- 50
 - Receptor 3 de esfingosina-1-fosfato (agonista),
 - Receptor de lisofosfatidato-2 (agonista)
- 55
 - Receptor 2 de esfingosina-1-fosfato (agonista)
 - Receptor 4 de esfingosina-1-fosfato (agonista),
 - Receptor de lisofosfatidato-3 (agonista)
- 60
 - Receptor 5 de esfingosina-1-fosfato (agonista)

- GPCR de proteína de hormona de clase A (agonista),
- FSH (agonista),
- 5 – Receptor de hormona luteinizante (agonista),
- TSH (agonista),
- 10 – Leucotrieno (agonista),
- Receptor de leucotrieno BLT (agonista),
- Receptor de cisteinil leucotrieno (agonista),
- 15 – Melatonina (agonista),
- Melatonina MT1 (agonista),
- Melatonina MT2 (agonista),
- 20 – Melatonina MT3 (agonista)
- GPCR tipo nucleótido de clase A (agonista),
- 25 – Receptor de adenosina (agonista),
- Receptor P2Y (agonista),
- GPCR huérfano de clase A (agonista),
- 30 – Grelina (agonista),
- GPCR de péptido de clase A (agonista),
- 35 – Receptor de angiotensina (agonista),
- Receptor de angiotensina I (agonista),
- Receptor de angiotensina II (agonista),
- 40 – Receptor de bombesina (agonista),
- Receptor de bombesina BB1 (agonista)
- 45 – Receptor de bombesina BB2 (agonista)
- Receptor de bombesina bb3 (agonista),
- Ligando peptídico de liberación de gastrina,
- 50 – Ligando de neuromedina B
- Ligando de neuromedina C
- 55 – Receptor de bradiquinina (agonista),
- Receptor de bradiquinina B1 (agonista),
- Receptor de bradiquinina B2 (agonista),
- 60 – Receptor C3a (agonista),

- C5a (agonista),
- Receptor CCK (agonista),
- 5 – Receptor CCK 1 (agonista),
- Receptor CCK 2 (agonista),
- 10 – Gastrina (agonista),
- Quimiocina (agonista),
- Receptor de quimiocinas CC (agonista),
- 15 – Quimiocina CCR1 (agonista),
- Quimiocina CCR2 (agonista),
- 20 – Quimiocina CCR3 (agonista),
- Quimiocina CCR4 (agonista),
- Quimiocina CCR5 (agonista),
- 25 – Quimiocina CCR6 (agonista),
- Quimiocina CCR7 (agonista)
- 30 – Quimiocina CCR8 (agonista),
- Quimiocina CCR9 (agonista)
- Quimiocina CCR10 (agonista),
- 35 – Quimiocina CCR11 (agonista)
- Receptor de quimiocinas CX3C (agonista),
- 40 – Quimiocina CX3CR1 (agonista),
- Quimiocina XCR1 (agonista)
- Receptor de quimiocinas CXC (agonista),
- 45 – Quimiocina CXCR1 (agonista)
- Quimiocina CXCR3 (agonista),
- 50 – Quimiocina CXCR4 (agonista),
- Quimiocina CXCR5 (agonista)
- Receptor de adrenomedulina (agonista),
- 55 – Endotelina (agonista),
- Endotelina ET-A (agonista),
- 60 – Endotelina ET-B (agonista),

- Galanina (agonista),
- Galanina GAL1 (agonista),
- 5 – Galanina GAL2 (agonista),
- Galanina GAL3 (agonista)
- IL-9 (agonista),
- 10 – Receptor KiSS-1 (agonista),
- Hormona concentradora de melanina (agonista),
- 15 – Receptor 1 de MCH (agonista)
- Receptor 2 de MCH (agonista)
- Melanocortina (agonista),
- 20 – Melanocortina MC1 (agonista),
- Receptor ACTH (agonista),
- 25 – Melanocortina MC3 (agonista),
- Melanocortina MC4 (agonista),
- Melanocortina MC5 (agonista),
- 30 – NK (agonista),
- NK1 (agonista),
- 35 – NK2 (agonista)
- NK3 (agonista), fármacos: 1
- Receptor de neuropéptido Y (agonista),
- 40 – Receptor de neuropéptido Y1 (agonista)
- Receptor de neuropéptido Y2 (agonista),
- 45 – Receptor de neuropéptido Y4 (agonista),
- Receptor de neuropéptido Y5 (agonista),
- Receptor de neuropéptido Y6 (agonista)
- 50 – Receptor de neurotensina (agonista),
- Neurotensina NTS1 (agonista),
- 55 – Neurotensina NTS2 (agonista)
- Receptor de orexina y neuropéptido FF (agonista),
- Orexina (agonista),
- 60 – Opioide (agonista),

- 5
 - Opioide delta (agonista),
 - Opioide kappa (agonista),
 - Opioide mu (agonista),
 - Receptor ORL1 (agonista),
- 10
 - Opioide (agonista parcial)
 - Opioide sigma (agonista),
- 15
 - Receptor de orexina y neuropéptido FF (agonista),
 - Receptor de neuropéptido FF (agonista),
 - Receptor de neuropéptido FF1 (agonista)
- 20
 - Receptor de neuropéptido FF2 (agonista),
 - Orexina (agonista),
- 25
 - Orexina 1 (agonista)
 - Orexina 2 (agonista)
 - Receptor activado por proteasa (agonista),
- 30
 - Receptor 1 activado por proteasa (agonista),
 - Receptor 2 activado por proteasa (agonista),
 - Receptor 3 activado por proteasa (agonista)
- 35
 - Receptor 4 activado por proteasa (agonista)
 - Receptor de prokineticina (agonista),
- 40
 - Receptor 1 de prokineticina (agonista),
 - Receptor 2 de prokineticina (agonista),
 - Somatostatina (agonista),
- 45
 - Somatostatina 1 (agonista),
 - Somatostatina 2 (agonista),
- 50
 - Somatostatina 3 (agonista),
 - Somatostatina 4 (agonista),
 - Somatostatina 5 (agonista),
- 55
 - Urotensina II (agonista),
 - Receptor tipo vasopresina (agonista),
- 60
 - Oxitocina (agonista),

- Vasopresina (agonista),
- Vasopresina V1 (agonista),
- 5 – Vasopresina V2 (agonista),
- Receptor prostanoide (agonista),
- Prostanoide DP (agonista),
- 10 – PGD2 (agonista),
- Prostanoide EP1 (agonista),
- 15 – PGE2 (agonista),
- Prostanoide EP2 (agonista),
- PGE2 (agonista),
- 20 – Prostanoide EP3 (agonista),
- PGE2 (agonista),
- 25 – Prostanoide EP4 (agonista),
- PGE2 (agonista),
- Prostanoide FP (agonista),
- 30 – PGF2 alfa (agonista),
- Prostanoide IP (agonista),
- 35 – Prostaciclina (agonista),
- Receptor prostanoide (agonista parcial)
- Prostanoide TP (agonista),
- 40 – Tromboxano A2 (agonista)
- Receptor de succinato 1 (agonista)
- 45 – TRH (agonista),
- TRH1 (agonista)
- TRH2 (agonista)
- 50 – Receptor vomeronasal tipo 1 (agonista)
- Receptor 1 vomeronasal tipo 1 (agonista)
- 55 – Receptor 2 vomeronasal tipo 1 (agonista)
- Receptor 3 vomeronasal tipo 1 (agonista)
- Receptor 4 vomeronasal tipo 1 (agonista)
- 60 – Receptor 5 vomeronasal tipo 1 (agonista)

- Receptor de apelina (modulador),
- Receptor cannabinoide (modulador),
- 5 – Receptor de quimiocinas tipo 1 (modulador),
- Receptor de lisoesfingolípidos (modulador),
- 10 – GPCR de proteína de hormona de clase A (modulador),
- Receptor de leucotrieno (modulador),
- Receptor de melatonina (modulador),
- 15 – GPCR similar a nucleótido de clase A (modulador),
- GPCR huérfano de clase A (modulador),
- 20 – Receptor de PAF (modulador),
- GPCR de péptido de clase A (modulador),
- Receptor prostanoide (modulador),
- 25 – Receptor de succinato 1 (modulador)
- Receptor de TRH (modulador),
- 30 – Receptor vomeronasal tipo 1 (modulador),

GPCR de clase B

- Receptor 3 acoplado a proteína G (modulador),
- 35 – Receptor 3 acoplado a proteína G (agonista)
- Receptor 3 acoplado a proteína G (antagonista),
- 40 – Receptor 6 acoplado a proteína G (modulador),
- Receptor 6 acoplado a proteína G (agonista)
- Receptor 6 acoplado a proteína G (antagonista),
- 45 – Receptor 12 acoplado a proteína G (modulador),
- Receptor 12 acoplado a proteína G (agonista)
- 50 – Receptor 12 acoplado a proteína G (antagonista),
- Receptor 14 acoplado a proteína G (modulador)
- Receptor 14 acoplado a proteína G (agonista)
- 55 – Receptor 14 acoplado a proteína G (antagonista)
- GPCR de clase B (agonista),
- 60 – Receptor CRF-1 (agonista)

- Receptor CRF-2 (agonista),
- Receptor de calcitonina (modulador),
- 5 – Calcitonina (agonista),
- Calcitonina (antagonista),
- 10 – Receptor de factor de liberación de ACTH (modulador),
- Receptor CRF-1 (modulador),
- Receptor CRF-1 (agonista)
- 15 – Receptor CRF-1 (antagonista),
- Receptor CRF-2 (modulador),
- 20 – Receptor CRF-2 (agonista),
- Receptor CRF-2 (antagonista),
- Factor de liberación de ACTH (agonista),
- 25 – Receptor CRF-1 (agonista)
- Receptor CRF-2 (agonista),
- 30 – Factor de liberación de ACTH (antagonista),
- Receptor CRF-1 (antagonista),
- Receptor CRF-2 (antagonista),
- 35 – Receptor peptídico similar a glucagón (modulador),
- Receptor peptídico 1 similar a glucagón (modulador),
- 40 – Receptor peptídico 2 similar a glucagón (modulador),
- Péptido similar a glucagón (agonista),
- Péptido similar a glucagón (antagonista),
- 45 – Receptor de glucagón (modulador),
- Glucagón (agonista),
- 50 – Glucagón (antagonista),
- Receptor de GHRH (modulador),
- GHRH (agonista),
- 55 – Factor de liberación de hormona del crecimiento (antagonista),
- Receptor de PACAP tipo I (modulador),
- 60 – Receptor de PACAP tipo I (agonista),
- Receptor de PACAP tipo I (antagonista)

- 5 – Receptor PTH (modulador),
- Receptor PTH-1 (modulador)
- Receptor PTH-2 (modulador)
- PTH (agonista),
- 10 – PTH (antagonista),
- Receptor de secretina (modulador),
- Secretina (agonista)
- 15 – Secretina (antagonista)
- Receptor VIP (modulador),
- 20 – Receptor VIP-1 (modulador),
- Receptor VIP-2 (modulador),
- 25 – VIP (agonista),
- VIP (antagonista),

GPCR de clase C

- 30 – GPCR de clase C (modulador),
- GPCR de clase C (agonista),
- Receptor GABA B (agonista),
- 35 – Receptor de glutamato metabotrópico (agonista),
- Receptor de glutamato metabotrópico 1 (agonista),
- 40 – Receptor de glutamato metabotrópico 2 (agonista),
- Receptor de glutamato metabotrópico 3 (agonista),
- Receptor de glutamato metabotrópico 4 (agonista),
- 45 – Receptor de glutamato metabotrópico 5 (agonista),
- Receptor de glutamato metabotrópico 6 (agonista)
- 50 – Receptor de glutamato metabotrópico 7 (agonista)
- Receptor de glutamato metabotrópico 8 (agonista)

55 Preferiblemente, dicho antígeno asociado a células es un antígeno que atraviesa la membrana, incluyendo pero sin limitarse a un antígeno seleccionado de canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

60 El experto apreciará que puede haber conformaciones tridimensionales específicas diferentes que están abarcadas por el término “conformación natural”. Si, por ejemplo, una proteína tiene dos o más conformaciones diferentes mientras se encuentra 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 rodopsina inducidos por la luz, o canales iónicos que muestran una conformación “cerrada” o “abierta”. La divulgación abarca secuencias de inmunoglobulina de una cualquiera de estas diferentes conformaciones naturales, es decir, de las diferentes clases de epítomos conformacionales que pueden estar presentes.

Un “ácido nucleico” de la divulgación puede estar en forma de ADN o ARN monocatenario o bicatenario, y está preferiblemente en forma de ADN bicatenario. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la divulgación pueden ser ADN genómico, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codón que se ha adaptado específicamente para expresión en la célula huésped u organismo huésped previstos).

Según una realización de la invención, el ácido nucleico de la divulgación está en forma esencialmente aislada, tal como se define en el presente documento.

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

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden prepararse u obtenerse de manera conocida *per se*, basándose en la información sobre el antígeno asociado a células o secuencias de inmunoglobulina de la divulgación, y/o puede aislarse de una fuente natural adecuada. Para proporcionar análogos, secuencias de nucleótidos que codifican para dominios de V_{HH} que se producen de manera natural pueden, por ejemplo, someterse a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar un ácido nucleico de la divulgación que codifica para dicho análogo. Además, tal como será evidente para el experto, para preparar un ácido nucleico de la divulgación, también varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica para un Nanobody y por ejemplo ácidos nucleicos que codifican para uno o más ligadores pueden unirse juntas de manera adecuada.

Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la divulgación resultarán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, síntesis de ADN automatizada; mutagénesis dirigida al sitio; combinar dos o más secuencias sintéticas y/o que se producen de manera natural (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que conducen a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que puede digerirse y/o ligarse fácilmente usando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción PCR usando uno o más cebadores “de emparejamiento incorrecto”, usando por ejemplo una secuencia de un GPCR que se produce de manera natural como molde. Estas y otras técnicas serán evidentes para el experto, y se hace referencia de nuevo a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente, así como a los ejemplos a continuación.

El ácido nucleico de la divulgación también puede estar en forma de, estar presente en y/o ser parte de un constructo genético, tal como será evidente para el experto en la técnica. Tales constructos genéticos comprenden generalmente al menos un ácido nucleico de la divulgación que está unido opcionalmente a uno o más elementos de constructos genéticos conocidos *per se*, tal como por ejemplo uno o más elementos reguladores adecuados (tales como un/unos promotor(es) adecuado(s), potenciador(es), terminador(es), etc.) y los elementos adicionales de constructos genéticos a los que se hace referencia en el presente documento. Tales constructos genéticos que comprenden al menos un ácido nucleico de la divulgación también se denominarán en el presente documento “constructos genéticos de la divulgación”.

Los constructos genéticos de la divulgación pueden ser ADN o ARN, y son preferiblemente ADN bicatenario. Los constructos genéticos de la divulgación también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped u organismo huésped previstos, en una forma adecuada para integración en el ADN genómico de la célula huésped prevista o en una forma adecuada para replicación, mantenimiento y/o herencia independientes en el organismo huésped previsto, o en una forma adecuada para inmunización genética. Por ejemplo, los constructos genéticos de la divulgación pueden estar en forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir un vector que puede proporcionar expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula huésped, organismo huésped y/o sistema de expresión adecuados). En una realización preferida pero no limitativa, un constructo genético de la divulgación comprende

a) al menos un ácido nucleico de la divulgación; conectado operativamente a

b) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado; y opcionalmente también

c) uno o más elementos adicionales de constructos genéticos conocidos *per se*; en los que los términos “elemento regulador”, “promotor”, “terminador” y “conectado operativamente” tienen su significado habitual en la técnica (tal como se describe además en el presente documento); y en los que dichos “elementos adicionales” presentes en los constructos genéticos pueden ser, por ejemplo secuencias 3'- o 5'-UTR, secuencias líder, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes indicadores, y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficiencia de) transformación o integración. Estos y otros elementos adecuados para tales constructos genéticos serán evidentes para el experto, y pueden, por ejemplo, depender del tipo de constructo usado, la célula huésped prevista, organismo huésped o animal que va a inmunizarse; la manera en la que las secuencias de nucleótidos de la divulgación de interés van a expresarse (por ejemplo, por medio de expresión constitutiva, transitoria o inducible);

y/o la técnica de transformación/vacunación que va a usarse. Por ejemplo, secuencias reguladoras, promotores y terminadores conocidos *per se* para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de dominio (individual) y fragmentos ScFv) pueden usarse de manera esencialmente análoga.

Preferiblemente, en los constructos genéticos de la divulgación, dicho al menos un ácido nucleico de la divulgación y dichos elementos reguladores, y opcionalmente dicho uno o más elementos adicionales, se “unen operativamente” entre sí, por lo que quiere decirse generalmente que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor se considera “unido operativamente” a una secuencia codificante si dicho promotor es capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en la que dicha secuencia codificante debe entenderse que está “bajo el control de” dicho promotor). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótidos se unen operativamente, estarán en la misma orientación y habitualmente también en el mismo marco de lectura. Habitualmente también serán esencialmente contiguos, aunque esto también puede no requerirse.

Preferiblemente, los elementos reguladores y adicionales de los constructos genéticos de la divulgación son tales que son capaces de proporcionar su función biológica prevista en la célula huésped u organismo huésped previstos.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser “operable” en la célula huésped u organismo huésped previstos, mediante lo cual quiere decirse que (por ejemplo) dicho promotor debe ser capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia codificante, a la que se une operativamente (tal como se define en el presente documento).

Para algunos ejemplos no limitativos (adicionales) de los promotores, marcadores de selección, secuencias líder, marcadores de expresión y elementos adicionales que pueden estar presentes/usarse en los constructos genéticos de la divulgación, tales como terminadores, potenciadores de la transcripción y/o de la traducción y/o factores de integración, se hace referencia a los manuales generales tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.* mencionados anteriormente, así como a los ejemplos que se proporcionan en los documentos WO 95/07463, WO 96/23810, WO 95/07463, WO 95/21191, WO 97/11094, WO 97/42320, WO 98/06737, WO 98/21355, US-A-6.207.410, US-A-5.693.492 y EP 1 085 089. Otros ejemplos serán evidentes para el experto. También se hace referencia a la técnica anterior general citada anteriormente y a las referencias adicionales citadas en el presente documento.

Los constructos genéticos de la divulgación pueden proporcionarse generalmente uniendo de manera adecuada la(s) secuencia(s) de nucleótidos de la divulgación al uno o más elementos adicionales descritos anteriormente, por ejemplo, usando las técnicas descritas en los manuales generales tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente.

A menudo, los constructos genéticos de la divulgación se obtendrán insertando una secuencia de nucleótidos de la divulgación en un vector de (expresión) adecuado conocido *per se*. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de vectores de expresión adecuados son los usados en los ejemplos a continuación, así como los mencionados en el presente documento.

Los ácidos nucleicos de la divulgación y/o los constructos genéticos de la divulgación pueden usarse para transformar una célula huésped u organismo huésped, es decir para la expresión y/o producción del Nanobody o polipéptido de la divulgación, o para vacunación genética. Los huéspedes o células huésped adecuados serán evidentes para el experto, y pueden, por ejemplo, ser cualquier línea celular o célula fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Según una realización no limitativa de la divulgación, las secuencias de inmunoglobulina, Nanobody o polipéptido de la divulgación se glicosilan. Según otra realización no limitativa de la divulgación, las secuencias de inmunoglobulina, Nanobody o polipéptido de la invención no se glicosilan.

En el contexto de la presente invención, “vacunación genética” incluye cualquier método o medio conocido para transferir una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia de ADN, en un camélido que es adecuado para inducir una respuesta inmunitaria a una proteína codificada por dicha secuencia de ácido nucleico. El experto conoce modos convencionales de vacunación genética. Según la invención, puede realizarse vacunación genética mediante una inyección de chorro sin aguja, mediante un método balístico, mediante inyecciones mediadas por aguja tales como tatuaje, mediante aplicación tópica del ADN sobre la piel en parches o mediante cualquiera de estos métodos de administración seguido por electroporación *in vivo*, y además incluye vacunación realizada mediante administración intradérmica, intramuscular o subcutánea de ADN.

En el contexto de vacunación genética, el término “genética” se refiere a cualquier tipo o clase adecuada de molécula de ácido nucleico, por ejemplo tal como se define en el presente documento, tal como ADN, ARN, ADNc, ADN bicatenario, incluyendo moléculas de ácido nucleico que comprenden nucleótidos modificados, tales como PNA, en los que dicha molécula de ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a células tal como se define en el presente documento, y es adecuada para provocar expresión en el camélido de modo que puede generarse una respuesta inmunitaria.

Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico comprenden ADN, ARN, PNA, ADNc, ADN bicatenario, así como otras formas de moléculas de ácido nucleico que comprenden modificaciones químicas para aumentar, por ejemplo, la estabilidad *in vivo* o *in vitro*.

Las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de un vector de expresión, plásmido, o cualquier otra molécula de ácido nucleico o constructo genético adecuado para expresar el antígeno en el animal. El experto conoce moléculas de ácido nucleico adecuadas, e incluyen vectores de expresión y plásmidos comercialmente disponibles. Los ejemplos específicos, no limitativos incluyen el constructo pVAX1 comercialmente disponible, o el vector de expresión eucariota pRc/CMV-Hbs que codifica para el antígeno de superficie pequeña de la hepatitis B (HBSAg) que puede obtenerse de Aldevron, que puede modificarse por ingeniería genética por medios de rutina para expresar el antígeno de interés.

Algunos ejemplos no limitativos de vectores para su uso en células de mamífero incluyen: pMAMneo (Clontech), pADNc3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC37199), pRSVneo (ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565), así como sistemas de expresión basados en virus, tales como los basados en adenovirus.

La vacunación genética se realizará mediante un ácido nucleico o constructo genético adecuados, que comprende elementos adecuados para expresar el antígeno diana en el animal no humano. Tales elementos comprenderán elementos que codifican para la información estructural del antígeno, o partes del mismo, siempre que los epítomos conformacionales de interés se representen mediante esta información estructural. El constructo genético también puede comprender elementos que son responsables del control de expresión, tales como promotores adecuados, potenciadores, terminadores y otras secuencias de control conocidas por el experto. Específicamente, la invención abarca el uso de promotores lo que permite la expresión constitutiva después de la transfección *in vivo*. Un ejemplo específico, no limitativo de un promotor adecuado es el promotor de citomegalovirus (CMV) constitutivo. El experto conoce una multitud de promotores adecuados adicionales, incluyendo, pero sin limitarse a promotores para la expresión en células de mamífero: potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano; variante de promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV) que contiene dos secuencias operadoras de tetraciclina de modo que el promotor puede regularse por el represor Tet; promotor de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple; potenciador/promotor de repetición terminal larga de virus del sarcoma de Rous (LTR de RSV); promotor de factor de elongación 1 α (hEF-1 α) de humano, chimpancé, ratón o rata; el promotor temprano SV40; promotor de repetición terminal larga VIH-1; promotor de β -actina.

La invención abarca la producción de las moléculas de ácido nucleico requeridas para la vacunación genética en cantidades adecuadas mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede producirse ADN de plásmido de bajo contenido en endotoxinas usando el kit Gigaprep libre de endotoxinas (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Para la vacunación genética, la molécula de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento puede formularse de manera adecuada. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico, tal como un vector o plásmido se reconstituye finalmente en H₂O libre de endotoxinas, preferiblemente H₂O de LAL (lisado de amebocitos de Limulus) (es decir, agua que se ha sometido a prueba para determinar las endotoxinas mediante LAL) o en NaCl al 0,9% libre de endotoxinas en H₂O de LAL, u otro tampón o disolución adecuados conocidos por el experto. La molécula de ácido nucleico reconstituida puede almacenarse en disolución en alícuotas a -20°C, o alternativamente puede almacenarse en forma liofilizada para la reconstitución antes de su uso.

La molécula de ácido nucleico se diluirá hasta una dilución adecuada para su uso en vacunación genética, por ejemplo, a una concentración de 0,1 a 10 mg/ml, específicamente de 1 a 5 mg/ml, más específicamente de 1 mg/ml.

Para la vacunación genética, la molécula de ácido nucleico se administrará al animal de manera adecuada, tal como se señala en el presente documento. Ejemplos específicos de métodos adecuados para aplicación intradérmica de ADN comprenden inyección de chorro libre de aguja (Pig-jet), un método de tatuaje (Bins, *et al.*, Nature Medicine 11:899-904), inyección de chorro libre de aguja usando el Vaccijet (Robbins Instruments, EE.UU.), administración tópica de ADN sobre la piel por medio de parches o la pistola génica Helios (Biorad) como método balístico para administrar el ADN. Todos los métodos de administración de ADN pueden seguirse por electroporación *in vivo* para potenciar la eficiencia de transfección celular.

En el contexto de cualquiera de los métodos anteriores, el ácido nucleico puede asociarse con un portador adecuado. Por ejemplo, el ácido nucleico puede asociarse con partículas, incluyendo, pero sin limitarse a partículas de oro. El experto conoce técnicas de rutina para asociar ácidos nucleicos con portadores adecuados.

En el contexto de la presente invención, "animal no humano" es un camélido y preferiblemente llama o alpaca.

B) El método de la presente invención

La presente divulgación se refiere a un método para la generación de secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por un antígeno asociado a células, tal como se define en el presente documento. El método comprende, pero no se limita, a las siguientes etapas:

a) vacunación genética de un animal no humano con un ácido nucleico que codifica para dicho antígeno asociado a células o un dominio o parte específica de dicho antígeno asociado a células como fusión genética a, por ejemplo, elementos genéticos moduladores inmunitarios o un dominio o parte específica de dicho antígeno asociado a células injertado en una secuencia ortóloga de camélido; y

b) opcionalmente refuerzo del animal con dicho antígeno en su conformación natural seleccionado de células que comprenden células naturales o transfectadas que expresan el antígeno asociado a células (o dominios de antígeno o una parte específica de dicho antígeno), extractos de membrana derivados de células, vesículas o cualquier otro derivado de membrana que alberga antígeno enriquecido, liposomas, o partículas de virus que expresan el antígeno asociado a células

c) examen de un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina derivadas de dicho animal no humano para secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por dicho antígeno asociado a células

Por tanto, en términos generales, el método de la presente divulgación incluye vacunación genética de un animal no humano tal como se define en el presente documento. En una realización particular, el animal no humano es un camélido.

Una ventaja particular de la presente divulgación reside en el hecho de que proporciona un método robusto para generar secuencias de inmunoglobulina que es ampliamente aplicable a una variedad de antígenos. El método de la invención no se limita por la accesibilidad del antígeno de proteína. En particular, no existe requisito del antígeno purificado. Ventajosamente, el método también excluye la necesidad del antígeno expresado en una célula, o presente en un entorno de membrana, en que puede realizarse usando únicamente vacunación genética. Por tanto, el método de la presente divulgación es ampliamente aplicable a cualquiera de los antígenos ejemplificados anteriormente, pero sin limitarse a los mismos. En particular, el presente método es aplicable a antígenos para los que se conoce una secuencia de ácido nucleico correspondiente, o puede identificarse mediante medios de rutina.

Por tanto, la presente divulgación es ventajosa en comparación con los métodos de la técnica anterior que carecen de tal aplicabilidad robusta y amplia. En particular, no existe enseñanza en la técnica para un método robusto de este tipo para la generación de secuencias de inmunoglobulina en animales tales como camélidos, en particular llama. Específicamente, la presente divulgación proporciona un método mejorado para generar secuencias de inmunoglobulina contra antígenos asociados a células, que, según una realización específica, es sin la necesidad de un refuerzo con proteína purificada, induciendo una respuesta inmunitaria por medio de vacunación con ADN y posterior examen de secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse al antígeno asociado a células. Más particularmente, la presente divulgación proporciona un método para la generación de secuencias de inmunoglobulina, incluyendo Nanobodies, contra un antígeno asociado a células que comprende las etapas de:

a) vacunación de un camélido con un ácido nucleico que codifica para dicho antígeno asociado a células (o dominios de antígeno o una parte específica de dicho antígeno); y

b) examen de un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina derivadas de dicho camélido para secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por dicho antígeno asociado a células.

También se ha encontrado sorprendentemente, que incluso en casos en los que el título de anticuerpos en suero fue menor tras la vacunación con ADN en comparación con la inmunización basada en proteínas o células, el examen de secuencias de inmunoglobulina específicas proporcionó tasas de aciertos comparables, es decir, pudo obtenerse una frecuencia comparable de secuencias de inmunoglobulina específicas. Además, la afinidad de los aglutinantes identificados fue alta (tal como se define en el presente documento). Esto subraya la ventaja particular de la presente divulgación de que da como resultado una respuesta de inmunoglobulina de alta afinidad más específica, y que permite un examen y aislamiento más eficientes de secuencias de inmunoglobulina específicas. Era imprevisible a partir de la técnica anterior que tales ventajas pudieran obtenerse mediante la vacunación con ADN, en particular cuando el animal inmunizado presenta una respuesta inmunitaria más baja en cuanto a título de anticuerpos en suero.

La presente invención proporciona un método según las reivindicaciones. La generación de secuencias de inmunoglobulina, incluyendo Nanobodies, contra un antígeno asociado a células comprende las etapas de:

a) vacunación de un camélido con un ácido nucleico que codifica para dicho antígeno asociado a células (o dominios de antígeno o una parte específica de dicho antígeno);

b) refuerzo del camélido con antígeno asociado a células en su conformación natural, por ejemplo mediante el uso de células transfectadas que expresan el antígeno asociado a células (o dominios de antígeno o una parte específica de dicho antígeno), con extractos de membrana celular o con partículas de virus que expresan el antígeno asociado a células, y

c) examen de un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina derivadas de dicho camélido para secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por dicho antígeno asociado a células.

Vacunación

En el método de la invención, se realiza vacunación genética adecuada para inducir una respuesta inmunitaria en el animal. Más específicamente, la vacunación genética debe ser adecuada para inducir una respuesta inmunitaria tal como se refleja en la generación de secuencias de inmunoglobulina en el animal. La detección de una respuesta de anticuerpo en el suero del animal también se denomina "conversión sérica". El experto puede monitorizar la vacunación genética determinando la respuesta de anticuerpo mediante medios de rutina. Por tanto, el experto puede determinar fácilmente la dosis y frecuencia adecuadas que se requieren para inducir una respuesta de anticuerpo apropiada.

Preferiblemente, la vacunación genética inducirá un título de anticuerpos adecuado. El título de anticuerpos se corresponderá con el número de células productoras de anticuerpos específicos, que permitirá la generación de secuencias de inmunoglobulina mediante aislamiento y/o selección. Sin embargo, tal como se señaló anteriormente, el método de la presente invención permite el aislamiento ventajoso de secuencias de inmunoglobulina de alta afinidad incluso cuando sólo hay un título de anticuerpos bajo en suero en comparación con métodos convencionales. Por ejemplo, la vacunación genética permitirá el aislamiento ventajoso de secuencias de inmunoglobulina de alta afinidad a títulos de anticuerpos en suero que son, por ejemplo, 3 veces menores en comparación con los títulos en suero obtenidos tras un refuerzo proteico (que son comparables a los títulos de anticuerpos que pueden obtenerse mediante técnicas de inmunización con proteínas convencionales). En una realización particular, los títulos de anticuerpos en suero pueden ser 5 veces menores, preferiblemente 10 veces menores. Los títulos séricos pueden determinarse mediante métodos convencionales, que incluyen por ejemplo ELISA o FACS.

Un aspecto adicional de importancia para la presente invención es la amplitud del repertorio de anticuerpos obtenidos mediante vacunación genética. En particular, un aspecto de la presente invención es que la respuesta de anticuerpo se refiere a tanto epítopos lineales como conformacionales, y de manera importante se refiere a epítopos conformacionales dependientes de membrana.

Por tanto, la presente invención se refiere a vacunación genética adecuada para obtener una respuesta de anticuerpo de un título y amplitud adecuados en los animales no humanos.

En una realización, la presente invención puede implicar una vacunación genética única en uno o múltiples sitios del animal. Por ejemplo, un camélido puede inyectarse en 1, 2, 3, 4, 5 o múltiples sitios, que pueden estar adyacentes entre sí o distribuidos sobre el cuerpo del animal en ubicaciones adecuadas. En un ejemplo específico, el camélido, una llama, recibe vacunación genética en hasta cinco sitios adyacentes en el cuello. Es evidente que las zonas para la vacunación genética tienen que estar limpias y libres de pelo. Por tanto, la invención abarca medios adecuados para eliminar el vello, tales como el afeitado y medios químicos tales como cremas de depilación o la eliminación física del vello a través de una cinta.

En un aspecto de la invención, se ha encontrado sorprendentemente que la ubicación de la administración de la vacuna de ADN tiene una influencia sobre las secuencias de inmunoglobulina que pueden obtenerse, en particular en cuanto a diversidad y preferencia de epítopo.

La invención abarca vacunación genética repetida, por ejemplo 2, 3, 4 ó 5 secuencias de vacunación genética en intervalos de tiempo adecuados. Tales intervalos serán preferiblemente de días a semanas, por ejemplo de 3 días a 4 semanas, más preferiblemente de 5 días a dos semanas. Intervalos adecuados comprenden, vacunación genética en 0, 3, 7, 21, 24, 28, 56, 59 y 63 días, alternativamente en 0, 14, 28 y 57 días, alternativamente en los días 0, 3, 7, 21, 24, 28, 56, 59 y 63, alternativamente en los días 0, 14, 28 y 42.

En una realización específica, se realiza vacunación genética semanalmente o cada dos semanas, hasta que se obtenga una respuesta de anticuerpos adecuada en el animal.

En una realización específica adicional, se realiza administración intradérmica, por ejemplo, mediante inyección libre de agujas, en los días 0, 14, 28 y 57. En otra realización específica, el método de tatuaje de intervalos cortos, el tatuaje se realiza en los días 0, 3, 7, 21, 24, 28, 56, 59 y 63. Un ejemplo específico adicional comprende inmunización mediante inyección libre de agujas en los días 0, 14, 28 y 42. En un método balístico de vacunación genética, la dosis puede ser de 12 inyecciones de 1 µg de ADN/mg de oro a un ajuste de presión de hasta 500-600

psi, administrada a intervalos de 0, 14, 28 y 42 días.

En una realización particular, la presente invención se refiere a vacunación genética usando una técnica de administración de ADN adecuada seguido por electroporación *in vivo*. Se ha encontrado sorprendentemente que este modo de administración es ventajoso en comparación con los métodos convencionales de vacunación genética. Por ejemplo, la electroporación *in vivo* es ventajosa en cuanto a eficacia de vacunación, es decir, da como resultado una respuesta inmunitaria más pronunciada y/o más fiable. Más fiable en este contexto significa que se observa una variabilidad menor en la respuesta inmunitaria, en particular en el número de “aciertos” que puede obtenerse mediante examen, entre animales individuales. Además, el uso de electroporación permite, cambiando los ajustes del sistema, para adaptar fácilmente el protocolo de vacunación a la profundidad de penetración requerida, por ejemplo, para seleccionar entre vacunación intradérmica, subcutánea o intramuscular. Además, considerando la piel relativamente gruesa y dura de algunos animales, tales como camélidos, la electroporación también permite una buena eficacia de vacunación, y la fácil adaptación a diversas ubicaciones diferentes de inmunización caracterizadas por diferentes propiedades de la piel.

El experto puede seleccionar una dosis adecuada de moléculas de ácido nucleico para vacunación genética. Por ejemplo, puede usarse 0,1-10 mg de ácido nucleico, específicamente 1-5 mg, más específicamente de 1 a 2 mg, o 1 mg de ácido nucleico para una aplicación de vacunación genética (por ejemplo, en el día 0), dando como resultado una dosis acumulativa que depende del número de vacunaciones genéticas repetidas.

Cuando se ha confirmado una respuesta de anticuerpo adecuada en el animal, las secuencias de inmunoglobulina pueden, en una realización de la divulgación, aislarse directamente de dicho animal, es decir, sin refuerzo proteico, mediante métodos tal como se describen en el presente documento. Las respuestas de detección de anticuerpo pueden realizarse mediante medios de rutina, tales como ELISA, RIA, FACS, o cualquier otro método para detectar anticuerpos.

Refuerzo proteico

El método también incluye refuerzo del animal con una fuente de proteína adecuada. En particular, se prevé reforzar al animal con composiciones que comprenden el antígeno asociado a células tal como se define en el presente documento, en particular un antígeno transmembrana, en su conformación natural. Tales composiciones pueden comprender células que expresan el antígeno, o fragmentos o derivados de la célula, tales como fracciones de membrana, orgánulos aislados, u otras preparaciones adecuadas. También se prevén virus, liposomas, micelas u otros sistemas que son adecuados para contener el antígeno asociado a células en su conformación natural.

En un aspecto de la invención, el antígeno puede expresarse en una célula homóloga. Por ejemplo, para la inmunización de un camélido, el antígeno puede expresarse en una célula de camélido. El sistema inmunitario del camélido será tolerante a la célula de camélido, es decir, no generará una respuesta inmunitaria a la mayoría de los antígenos comprendidos en esta célula. Sin embargo, si un antígeno heterólogo, que incluye pero no se limita a los antígenos asociados a células tal como se define en el presente documento, se introduce artificialmente en dicha célula, el sistema inmunitario del animal generará una respuesta inmunitaria específicamente dirigida a dicho antígeno.

Esto tiene la ventaja de que la respuesta inmunitaria se dirigirá principalmente al antígeno de interés, es decir, se caracterizará por una especificidad potenciada hacia este antígeno. El experto apreciará que este enfoque puede usarse para especies relacionadas. Por ejemplo, las células derivadas de camellos pueden usarse para la inmunización de la llama, y viceversa, en vista de su estrecha relación.

Puede usarse cualquier célula adecuada que sea homóloga al animal que va a inmunizarse. Por ejemplo, las células de camélido pueden usarse para la inmunización de camélidos, por ejemplo, células de llama para inmunización de llama. Las células adecuadas comprenderán, pero no se limitan a, células que son espontáneamente inmortales, por ejemplo, células cancerosas o células indiferenciadas, tales como las células derivadas de embriones. Las células adecuadas también abarcan células immortalizadas artificialmente por medios conocidos.

Las células pueden tratarse ventajosamente antes de la administración a los animales, de manera que se reduce o elimina su proliferación *in vivo*. Los tratamientos adecuados comprenden, pero no se limitan a tratamientos químicos y físicos. Un ejemplo específico de un tratamiento físico adecuado es la irradiación con rayos X, de modo que las células ya no puedan proliferar.

Cualquiera de las células anteriores también puede usarse para inmunizar a un animal no humano tal como se define en el presente documento en su propio derecho, es decir, independiente de la vacunación con ADN.

Preferiblemente, la proteína está enriquecida en cualquiera de las preparaciones anteriores, para fortalecer la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la expresión recombinante en células que usan promotores altamente eficaces puede usarse para aumentar la cantidad de antígeno por célula. En una realización, cuando se usan camélidos como el animal no humano, las células que expresan el antígeno de interés pueden ser células derivadas de

camélidos, preferiblemente células derivadas de camélidos inmortalizadas. Las células serán modificadas genéticamente para expresar dicho antígeno.

Además, el experto entenderá que la invención también abarca el uso de un adyuvante comúnmente usado con el fin de potenciar una respuesta inmunitaria en el contexto de vacunación. La preparación de proteínas también puede estar en una forma física que potencia la respuesta inmunitaria, tal como por ejemplo un gel o emulsión. Los ejemplos específicos, no limitativos de un adyuvante incluyen Stimune o Specol (CEDI Diagnostics, Lelystad, Países Bajos), adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, TiterMax (Gold), lípido A de monofosforilo (MPL), Alum, QuilA, CpG ADN.

La presente invención comprende un único o múltiples refuerzos con dicha fuente de proteína en su conformación natural (opcionalmente usando un adyuvante). Los refuerzos proteicos se realizarán a intervalos adecuados, que pueden determinarse mediante medios de rutina, por ejemplo, monitorizando la respuesta de inmunoglobulina en los animales.

El refuerzo puede realizarse mediante diferentes vías de administración, incluyendo, pero sin limitarse a, administración intradérmica, subcutánea o intramuscular.

En una realización particular, la presente invención se refiere a la reducción del número de administraciones de proteína requeridas en un animal para provocar una respuesta inmunitaria adecuada. Por tanto, la estrategia de vacunación genética-refuerzo proteico (también denominada "sensibilización-refuerzo") eliminará la necesidad de refuerzo proteico repetido del animal. Esto, por un lado, reduce la carga en el animal, facilita y acelera el procedimiento, y reduce la cantidad de antígeno que es necesaria para producir las secuencias de inmunoglobulina. Por tanto, la estrategia de vacunación genética-refuerzo proteico de la presente invención puede dar como resultado sorprendentemente los mismos títulos de anticuerpos en la sangre de un animal, como método convencional que comprende refuerzos proteicos múltiples, incluso sin o si sólo se administra un único refuerzo proteico tras la vacunación genética.

Una ventaja particular adicional de una estrategia de sensibilización-refuerzo usando células como fuente de antígenos para el refuerzo reside en el hecho de que la respuesta de anticuerpo se caracterizará por una especificidad particularmente alta en comparación con enfoques conocidos. En otras palabras, debido a la sensibilización de ADN, la respuesta inmunitaria de recuerdo provocada por el refuerzo celular se dirigirá principalmente al antígeno de interés, y cualquier otro determinante antigénico en las células no afectará significativamente la respuesta inmunitaria global. Por tanto, la sensibilización de ADN-refuerzo celular según la presente invención es particularmente ventajosa en cuanto a especificidad, dando como resultado por tanto una "tasa de acierto" ventajosa, es decir un gran número de secuencias de inmunoglobulina específicas tras el examen.

Por tanto, en la realización que comprende un refuerzo proteico, los efectos técnicos particulares comprenden la respuesta inmunitaria potenciada. Además, se potenciará la diversidad de secuencia de diferentes Nanobodies funcionales que pertenecen al mismo linaje de células B. El refuerzo según la invención provoca la introducción de sustituciones de aminoácido antes no identificadas en comparación con secuencias identificadas tras la inmunización genética únicamente, que es una indicación para el refuerzo mediado por maduración *in vivo*.

Examen/aislamiento de secuencias de inmunoglobulina

La vacunación genética tal como se describe en el presente documento inducirá una respuesta inmunitaria en el animal. Entonces, se aísla un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina de los animales. "Aislamiento" incluye a) la separación de secuencias del animal, por ejemplo, tomando muestras de tejidos adecuados, y b) la señalización de secuencias específicas, por ejemplo, mediante examen, es decir el aislamiento de "aciertos" de aglutinantes específicos.

El experto conoce bien con técnicas para establecer conjuntos, colección o bibliotecas adecuadas de secuencias de inmunoglobulina, y examen de las mismas para las secuencias de interés. El experto puede hacer referencia general a las técnicas descritas en, por ejemplo, los documentos WO 02/085945 y en WO 04/049794. También puede hacerse referencia a técnicas y métodos descritos en los documentos WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 y WO 03/035694. Alternativamente, pueden usarse bibliotecas sintéticas o semisintéticas mejoradas derivadas de, por ejemplo, bibliotecas de V_{HH} , obtenidas de los animales inmunizados según la presente invención, tal como bibliotecas de V_{HH} obtenidas de bibliotecas de V_{HH} mediante técnicas tales como mutagénesis aleatoria y/o intercambio de CDR, tal como se describe por ejemplo en el documento WO 00/43507.

La invención incluye el aislamiento de material del animal que comprende secuencias de inmunoglobulina, tales como, pero sin limitarse a, células productoras de anticuerpos. Por ejemplo, pueden aislarse monocitos de sangre periférica (PBMC) mediante medios convencionales. Otro material incluye linfocitos de sangre periférica (PBL), ganglios linfáticos periféricos, en particular ganglios linfáticos que drenan el sitio de inmunización, el bazo, médula ósea, u otros materiales inmunológicamente relevantes.

En un ejemplo específico, no limitativo, pueden recogerse muestras de sangre que contienen células B, y pueden purificarse linfocitos de sangre periférica (PBL) mediante métodos convencionales. Por ejemplo, puede emplearse una centrifugación en gradiente de densidad en un instrumento Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante.

Cualquiera de los materiales descritos anteriormente, incluyendo por ejemplo PBL aislados del animal comprenderán una multitud de secuencias de inmunoglobulina, es decir un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina.

Entre esta multitud de secuencias de inmunoglobulina, por ejemplo, expresadas en PBMC, pueden aislarse directamente especificidades de inmunoglobulina deseadas, por ejemplo, mediante inmunocribado de las células.

Alternativamente, pueden aislarse, transferirse y expresarse secuencias de ácido nucleico que codifican para el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina, en un conjunto, colección o muestra de células o virus.

El material genético puede aislarse y procesarse adicionalmente mediante medios adecuados para aislar tales secuencias que codifican para las secuencias de inmunoglobulina de la especificidad deseada. Para este fin, por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican para dicha multiplicidad de secuencias de inmunoglobulina pueden extraerse del material mediante medios adecuados, y transferirse en un virus o célula receptora para la expresión. El experto está familiarizado con técnicas adecuadas para extracción de secuencias de inmunoglobulina y manipulación de estas secuencias para la expresión, por ejemplo en una biblioteca de expresión en células o virus. Algunos ejemplos no limitativos comprenden la generación de una biblioteca de expresión en, por ejemplo, *E. coli* o bacteriófagos.

En un ejemplo específico, no limitativo, puede extraerse ARN total a partir de dicho material. El ARN total puede convertirse en ADNc mediante medios conocidos. Usando este ADNc, pueden amplificarse secuencias de inmunoglobulina, tales como por ejemplo el repertorio de Nanobody, mediante medios de rutina, incluyendo por ejemplo PCR, o métodos de PCR anidada tal como se conoce en la técnica (véase las referencias de patente anteriores).

Pueden digerirse moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de inmunoglobulina mediante el uso de enzimas de restricción adecuadas, opcionalmente seguido por purificación, por ejemplo, mediante electroforesis en gel. Las secuencias digeridas pueden ligarse en sitios de restricción correspondientes en un constructo genético adecuado, tal como un vector o plásmido. Los ejemplos no limitativos de vectores adecuados incluyen vectores de presentación de fago, por ejemplo pAX50. pAX50 contiene el promotor LacZ, una secuencia que codifica para la proteína de colifago pIII, un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple (que alberga los sitios de restricción *Sfi*I y *Bst*EII) y una secuencia líder quimérica que consiste en los motivos pE de gen 3 y *Erwinia carotovora*. Este vector de presentación permite la producción de partículas de fago, que expresan los Nanobodies individuales como proteína de fusión con el producto génico III.

La molécula de ácido nucleico ligada puede usarse para obtener una biblioteca, por ejemplo, mediante transformación de un organismo huésped adecuado, como *E. coli*. El experto conoce técnicas adecuadas de transformación, por ejemplo, métodos químicos, electroporación, y otros. Por tanto, puede obtenerse una biblioteca de un tamaño adecuado, por ejemplo 1E7 a 1E8.

En una realización, pueden rescatarse bibliotecas haciendo crecer las bacterias hasta fase logarítmica (por ejemplo, DO600 = 0,5), seguido por infección con fago auxiliar para obtener fago recombinante que expresa el repertorio de secuencias de inmunoglobulina clonadas en la punta del fago como proteína de fusión pIII, el fago obtenido puede almacenarse, por ejemplo, tras esterilización por filtración, para su uso adicional, por ejemplo a 4°C.

Un conjunto, colección o biblioteca de células o virus se examina para células o virus que expresan secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por dicho antígeno asociado a células, más específicamente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tiene afinidad por dicho antígeno asociado a células puede purificarse y/o aislarse de la célula o virus, seguido por expresión de dicha secuencia de inmunoglobulina.

Por tanto, la presente invención también abarca etapa(s) de examen adecuada(s), para seleccionar y aislar las secuencias de inmunoglobulina dirigidas al antígeno de interés (o secuencias de ácido nucleico que codifican para el mismo) de una multitud de secuencias presentes en el animal no humano. Tales métodos de examen abarcan todos los métodos que son adecuados para la señalización de una célula, virus, constructo de expresión, o secuencia que se refiere a la secuencia de inmunoglobulina de interés. El experto es bien consciente de una multitud de técnicas adecuadas, incluyendo presentación de fago, inmunocribado, etc. Por supuesto, la invención también se refiere a combinaciones de métodos conocidos. Combinaciones adecuadas serán evidentes para el experto.

En una realización específica, la biblioteca de fagos que expresan secuencias de inmunoglobulina puede

seleccionarse mediante una única ronda, o múltiples rondas de cribado en una fuente adecuada de antígeno asociado a células, incluyendo, pero sin limitarse a células o liposomas (inmovilizados) que comprenden el antígeno de interés.

- 5 Tras una ronda de selección, por ejemplo, mediante inmunocribado, el producto puede volver a clonarse como agrupación en un vector de expresión adecuado para selección y/o procesamiento adicional.

Según la invención, la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tiene afinidad por dicho antígeno asociado a células puede purificarse y/o aislarse.

- 10 El experto puede usar técnicas convencionales para la producción de inmunoglobulinas. Por tanto, después de que una célula, virus o secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de inmunoglobulina de interés se ha identificado mediante un método de examen, dicha secuencia de inmunoglobulina puede producirse, por ejemplo por medio de expresión recombinante. Para este propósito, la célula o virus puede usarse directamente, o el ácido nucleico que codifica para la secuencia de inmunoglobulina puede transferirse a un sistema de expresión adecuado, que incluye una célula huésped adecuada. Las células huésped incluyen sistemas de mamífero, tales como células CHO, sistemas eucariotas tales como células de insecto u hongo, incluyendo por ejemplo *Pichia pastoris*, y sistemas procariontes tales como *E. coli*. El experto conoce vectores de expresión adecuados y herramientas para su uso en la expresión de secuencias de inmunoglobulina en estos sistemas huésped.

- 20 Las secuencias de inmunoglobulina, Nanobodies y ácidos nucleicos de la divulgación pueden prepararse de manera conocida *per se*, tal como será evidente para el experto a partir de la descripción en el presente documento. El experto entenderá cuáles de los ejemplos específicos son adecuados para vacunación genética, para la generación y/o examen de conjuntos, colecciones o bibliotecas de secuencias de inmunoglobulina, o para la producción de secuencias de inmunoglobulina tras la selección de secuencias específicas de antígeno.

- 25 Por ejemplo, los polipéptidos de la divulgación pueden prepararse de cualquier manera conocida *per se* para la preparación de anticuerpos y en particular para la preparación de fragmentos de anticuerpo (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de dominio (individual) y fragmentos ScFv).

- 30 Tal como será evidente para el experto, un método particularmente útil para preparar un polipéptido de la divulgación comprende generalmente las etapas de:

- 35 la expresión, en una célula huésped u organismo huésped adecuado (también denominado en el presente documento "huésped de la divulgación") o en otro sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifica para dicho Nanobody o polipéptido de la divulgación (también denominado en el presente documento "ácido nucleico de la divulgación", este término también se usa para los constructos genéticos para vacunación, tal como será evidente a partir del contexto específico), opcionalmente seguido por:

- 40 aislar y/o purificar el Nanobody o polipéptido de la divulgación así obtenido.

- Además, las inmunoglobulinas producidas pueden purificarse mediante técnicas convencionales, incluyendo precipitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, filtración, y otros métodos de purificación conocidos.

- 45 Además, las secuencias de inmunoglobulina pueden caracterizarse adicionalmente por métodos conocidos, por ejemplo, para determinar su especificidad de epítipo, cinética de unión, etc.

Secuencias de inmunoglobulina

- 50 La divulgación también se refiere a secuencias de inmunoglobulina, es decir las moléculas de polipéptido, que pueden obtenerse mediante un método tal como se describe en el presente documento, y composiciones que comprenden dichas secuencias de inmunoglobulina. Tales composiciones comprenden composiciones para propósitos de investigación así como composiciones farmacéuticas para su uso en terapia. El experto está familiarizado con técnicas convencionales y formulaciones para aplicación terapéutica de secuencias de inmunoglobulina. Por tanto, en un aspecto, el método de la presente invención abarca la purificación de secuencias de inmunoglobulina específicas y su formulación como composición farmacéutica.

- 60 La presente divulgación proporciona secuencias de inmunoglobulina en forma esencialmente aislada, por ejemplo una forma que es al menos el 90% pura, al menos el 95% pura, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,99% pura. En una realización no limitativa, pureza significa que no están presentes secuencias de otras inmunoglobulinas en la preparación. En una realización adicional no limitativa, pureza significa que en la composición no están presentes contaminantes del organismo productor.

- 65 La presente divulgación también abarca secuencias de inmunoglobulina que derivan de las secuencias de inmunoglobulina que pueden obtenerse mediante los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, la

divulgación abarca secuencias de inmunoglobulina humanizadas que pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. La divulgación también abarca variantes estructurales conocidas de secuencias de inmunoglobulina.

5 Secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra canales iónicos

La presente divulgación se refiere a secuencias de inmunoglobulina que se dirigen contra (tal como se define en el presente documento) canales iónicos, así como a compuestos o constructos, y en particular proteínas y polipéptidos, que comprenden o consisten esencialmente en una o más de tales secuencias de inmunoglobulina (también denominadas en el presente documento “secuencias de inmunoglobulina de la divulgación”, “compuestos de la divulgación”, y “polipéptidos de la divulgación”, respectivamente). La divulgación también se refiere a ácidos nucleicos que codifican para tales secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos (también denominados en el presente documento “ácidos nucleicos de la divulgación” o “secuencias de nucleótidos de la divulgación”); a métodos para preparar tales secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos; a células huésped que expresan o son capaces de expresar tales secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales secuencias de inmunoglobulina, polipéptidos, ácidos nucleicos y/o células huésped; y a usos de tales secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y/o composiciones, en particular con propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, tales como los propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico mencionados en el presente documento.

Xu *et al.*, Nature Biotechnology, octubre de 2005, 1289-1293 y Benham, Nature Biotechnology, octubre de 2005, 1234-1235, describen un enfoque para bloquear canales iónicos con una estructura de seis dominios transmembrana, en la que se usan anticuerpos policlonales producidos en conejos dirigidos contra un bucle extracelular específico, es decir, la tercera región extracelular (E3). Sin embargo, los anticuerpos policlonales de conejo no son adecuados para uso terapéutico en seres humanos. Por tanto, un objeto de la presente divulgación es proporcionar compuestos terapéuticos que pueden usarse en la prevención, tratamiento o diagnóstico de enfermedades y trastornos que se asocian con canales iónicos y/o con la actividad biológica y/o fisiológica de canales iónicos. Tal como se usa en el presente documento, “prevención” y “tratamiento” de una enfermedad o trastorno incluyen generalmente cualquier efecto profiláctico o terapéutico que beneficia a un sujeto que padece o corre el riesgo de padecer la enfermedad o trastorno, y por ejemplo también incluye aliviar o prevenir uno o más síntomas de la enfermedad y prevenir o ralentizar la aparición y/o la progresión (adicional) de la enfermedad.

En particular, un objeto de la presente divulgación es proporcionar tales compuestos terapéuticos que son capaces de modular canales iónicos. Por “modular canales iónicos” quiere decirse generalmente en el presente documento que el compuesto, tras entrar en contacto o interactuar adecuadamente de otro modo con el canal iónico (es decir, en las condiciones de un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado y/o en un modelo animal adecuado; y en particular en condiciones fisiológicas, es decir, tras administración adecuada a un sujeto), proporciona un efecto agonista o antagonista con respecto al canal iónico y/o con respecto a las funciones biológicas y/o fisiológicas asociadas con dicho canal iónico.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar compuestos terapéuticos que pueden usarse en la prevención, el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades y trastornos que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse, respectivamente, mediante el uso de los compuestos terapéuticos descritos en el presente documento en profilaxis o terapia (es decir, administrando uno o más de los compuestos a un sujeto que necesita tal tratamiento, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) o para propósitos de diagnóstico (también tal como se describe adicionalmente en el presente documento). En particular, un objetivo de la presente divulgación es proporcionar compuestos terapéuticos que pueden usarse en la prevención, el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades y trastornos que pueden tratarse, evitarse y/o diagnosticarse, respectivamente, modulando (tal como se define en el presente documento) al menos un canal iónico. Un objeto adicional es proporcionar tales compuestos, que no tienen las desventajas que se asocian con el uso de anticuerpos policlonales, con el uso de anticuerpos que se han producido en conejos, y con el uso de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales. También es un objeto de la presente divulgación proporcionar métodos que pueden usarse para generar fácilmente tales compuestos. Un objeto específico, no limitativo de la divulgación es proporcionar proteínas y/o polipéptidos dirigidos contra canales iónicos, y proporcionar secuencias de inmunoglobulina para su uso en tales proteínas o polipéptidos, que tienen propiedades terapéuticas y/o farmacológicas mejoradas y/u otras propiedades ventajosas (tales como, por ejemplo, facilidad mejorada de preparación y/o costes reducidos de bienes), en comparación con los anticuerpos de conejo policlonales convencionales descritos por Xu *et al* o fragmentos de los mismos. Estas propiedades mejoradas y ventajosas resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento. Los objetivos anteriores se logran generalmente mediante (el uso de) las secuencias de inmunoglobulina y composiciones descritas en el presente documento.

Las secuencias de inmunoglobulina, polipéptidos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse generalmente para modular la apertura y/o cierre (o potenciar la apertura y/o cierre) de canales iónicos y/o para modular el flujo de iones a través de canales iónicos (es decir, para aumentar o disminuir tal flujo, o para bloquear parcial o completamente tal flujo; de manera irreversible pero preferiblemente de manera reversible). Como tal, los polipéptidos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse generalmente para modular las funciones,

5 rutas, respuestas, efectos, mecanismos y acciones biológicas en las que están implicados canales iónicos y/o el flujo de iones a través de canales iónicos. En particular, los polipéptidos y composiciones de la divulgación pueden usarse para reducir o inhibir (es decir, total o parcialmente, y de manera irreversible pero preferiblemente de manera reversible) el flujo de iones a través de canales iónicos. Como tal, las secuencias de inmunoglobulina, polipéptidos y composiciones de la presente divulgación pueden actuar generalmente como bloqueantes (totales o parciales) y/o como abridores (completos y parciales) de canales iónicos (de nuevo de manera irreversible pero preferiblemente de manera reversible) y/o como agonistas o como antagonistas de canales iónicos y/o de las funciones, rutas, respuestas, efectos, mecanismos y acciones biológicas en las que están implicados canales iónicos y/o el flujo de iones a través de canales iónicos. Como tal, los polipéptidos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse para la prevención y tratamiento (tal como se define en el presente documento) de enfermedades y trastornos asociados con canales iónicos. Generalmente, "enfermedades y trastornos asociados con canales iónicos" pueden definirse como enfermedades y trastornos que pueden prevenirse y/o tratarse, respectivamente, administrando de manera adecuada a un sujeto que lo necesita (es decir, que tiene la enfermedad o trastorno o al menos un síntoma del mismo y/o en riesgo de atraer o desarrollar la enfermedad o trastorno) o bien un polipéptido o bien una composición de la divulgación (y en particular, de una cantidad farmacéuticamente activa del mismo) y/o un principio activo conocido activo contra canales iónicos. Los ejemplos de tales enfermedades y trastornos asociados con canales iónicos resultarán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento, y por ejemplo, incluyen las enfermedades y trastornos mencionados en la técnica anterior citados en el presente documento, dependiendo del/de los canal(es) iónico(s) a los que se dirige la secuencia de inmunoglobulina o compuesto/polipéptido de la divulgación. Por tanto, sin limitarse a lo mismo, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden, por ejemplo, usarse para prevenir y/o tratar todas las enfermedades y trastornos que están previniéndose o tratándose actualmente con principios activos que pueden modular canales iónicos, tales como los mencionados en la técnica anterior citada anteriormente. También se prevé que los polipéptidos de la divulgación puedan usarse para prevenir y/o tratar todas las enfermedades y trastornos para los que el tratamiento con tales principios activos se está desarrollando actualmente, se ha propuesto, o se propondrá o se desarrollará en el futuro. Además, se prevé que, debido a sus propiedades favorables tal como se describe adicionalmente en el presente documento, los polipéptidos de la presente divulgación pueden usarse para la prevención y tratamiento de otras enfermedades y trastornos que aquellos para los que estos principios activos conocidos se están usando o se propondrán o se desarrollarán; y/o que los polipéptidos de la presente divulgación pueden proporcionar nuevos métodos y regímenes para tratar las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento.

Otras aplicaciones y usos de las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación resultarán más evidentes para el experto a partir de la divulgación adicional en el presente documento. En general, la divulgación proporciona secuencias de inmunoglobulina que se dirigen contra (tal como se define en el presente documento) y/o pueden unirse específicamente (tal como se define en el presente documento) a canales iónicos; así como compuestos y constructos, y en proteínas y polipéptidos particulares, que comprenden al menos una secuencia de inmunoglobulina de este tipo. Más en particular, la divulgación proporciona secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a canales iónicos con una afinidad (medida y/o expresada de manera adecuada como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off} , o alternativamente como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento; así como compuestos y constructos, y en proteínas y polipéptidos particulares, que comprenden al menos una secuencia de inmunoglobulina de este tipo.

En particular, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación son preferiblemente tales que:

- se unen a canales iónicos 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} litro/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litro/moles);

y/o de modo que:

- se unen a canales iónicos con una velocidad k_{on} de entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;

y/o de modo que:

- se unen a canales iónicos con una velocidad k_{off} de entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ 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} .

Preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina monovalente de la divulgación (o un polipéptido que contiene sólo una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) es preferiblemente tal que se unirá a canales iónicos 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. Algunos valores de CI_{50} preferidos para la unión de las secuencias de inmunoglobulina o

polipéptidos de la divulgación a canales iónicos resultarán evidentes a partir de la descripción adicional y ejemplos en el presente documento. Para la unión a canales iónicos, una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación contendrá habitualmente dentro de su secuencia de inmunoglobulina uno o más residuos de aminoácido o uno o más tramos de residuos de aminoácido (es decir, con cada “tramo” que comprende dos o residuos de aminoácido que son adyacentes entre sí o en estrecha proximidad entre sí, es decir, en la estructura primaria o terciaria de la secuencia de inmunoglobulina) por medio de la cual la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación puede unirse a canales iónicos, cuyos residuos de aminoácido o tramos de residuos de aminoácido forman, por tanto, el “sitio” para la unión a canales iónicos (también denominado en el presente documento “sitio de unión a antígeno”).

Las secuencias de inmunoglobulina proporcionadas por la divulgación están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de una proteína o polipéptido de la divulgación (tal como se define en el presente documento), que puede comprender o consistir esencialmente en una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación y que puede comprender opcionalmente de manera adicional una o más secuencias adicionales de inmunoglobulina (todas unidas opcionalmente por medio de uno o más ligadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, la una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación pueden usarse como unidad de unión en una proteína o polipéptido de este tipo, que puede contener opcionalmente una o más secuencias de inmunoglobulina adicionales que pueden servir como unidad de unión (es decir, contra una o más de otras dianas que canales iónicos), para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico de la divulgación, respectivamente, todo tal como se describe en el presente documento. Una proteína o polipéptido de este tipo también puede estar en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento).

Las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación son tales que consisten preferiblemente de manera esencial en una única cadena de aminoácidos que no está unida por medio de puentes disulfuro a cualquier otra secuencia o cadena de inmunoglobulina (pero que puede o no contener uno o más puentes disulfuro intramoleculares. Por ejemplo, se conoce que los Nanobodies, tal como se describe en el presente documento, pueden contener a veces un puente disulfuro entre CDR3 y CDR1 o FR2). Sin embargo, debe indicarse que una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación pueden unirse entre sí y/o a otras secuencias de inmunoglobulina (por ejemplo, por medio de puentes disulfuro) para proporcionar constructos peptídicos que también pueden ser útiles en la divulgación (por ejemplo, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, constructos ScFv, “diacuerpos” y otros constructos multiespecíficos. Se hace referencia, por ejemplo, a la revisión de Holliger y Hudson, Nat Biotechnol. Septiembre de 2005;23(9):1126-36)). Generalmente, cuando una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación (o un compuesto, constructo o polipéptido que comprende la misma) se propone para administración a un sujeto (por ejemplo, para propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico tal como se describe en el presente documento), es preferiblemente o bien una secuencia de inmunoglobulina que no se produce de manera natural en dicho sujeto; o, cuando se produce de manera natural en dicho sujeto, en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento).

También será evidente para el experto que para uso farmacéutico, las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (así como compuestos, constructos y polipéptidos que comprenden las mismas) se dirigen preferiblemente contra canales iónicos humanos; mientras que para propósitos veterinarios, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación se dirigen preferiblemente contra canales iónicos de las especies que van a tratarse, o al menos de reactividad cruzada con canales iónicos de las especies que van a tratarse.

Además, una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación puede contener opcionalmente, y además del al menos un sitio de unión para la unión contra canales iónicos, uno o más sitios de unión adicionales para la unión contra otros antígenos, proteínas o dianas.

La eficacia de las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación y de composiciones que comprenden las mismas, puede someterse a prueba usando cualquier ensayo *vitro*, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o trastorno específico implicado. Ensayos y modelos animales adecuados serán evidentes para el experto, y por ejemplo incluyen los ensayos y modelos animales a los que se hace referencia en las revisiones y técnica anterior citadas en el presente documento.

Además, según la divulgación, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos que se dirigen contra canales iónicos de una primer especie de animal de sangre caliente puede o no mostrar reactividad cruzada con canales iónicos de una o más de otras especies de animal de sangre caliente. Por ejemplo, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos dirigidos contra canales iónicos humanos pueden o no mostrar reactividad cruzada con canales iónicos de una o más de otras especies de primates (tal como, sin limitación, ratón, monos del género *Macaca* (tales como, y en particular, macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) y/o macacos de la India (*Macaca mulatta*)) y babuino (*Papio ursinus*)) y/o con canales iónicos de una o más especies de animales que se usan a menudo en modelos animales para enfermedades (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo o perro), y en particular en modelos animales para enfermedades y trastornos asociados con canales iónicos (tales como las especies y modelos animales mencionados en el presente documento). A este respecto, resultará evidente para el experto que tal reactividad cruzada, cuando está presente, puede tener ventajas desde un punto de vista de desarrollo de

fármacos, puesto que permite que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos contra canales iónicos humanos se sometan a prueba en tales modelos de enfermedad.

Más generalmente, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación que tienen reactividad cruzada con canales iónicos de múltiples especies de mamífero, serán habitualmente ventajosas para su uso en aplicaciones veterinarias, puesto que permitirá que la misma secuencia de inmunoglobulina o polipéptido se use en múltiples especies. Por tanto, también se abarca dentro del alcance de la invención que puedan usarse secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos dirigidas contra canales iónicos de una especie de animal (tal como secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos contra canales iónicos humanos) en el tratamiento de otra especie de animal, siempre que el uso de las secuencias de inmunoglobulina y/o polipéptidos proporcionen los efectos deseados en las especies que van a tratarse.

Las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (así como polipéptidos que comprende las mismas) son preferiblemente tales que son capaces de modular (tal como se define en el presente documento) un canal iónico. En particular, las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (así como polipéptidos que comprenden las mismas) son preferiblemente tales que son capaces de bloquear (total o parcialmente) un canal iónico. Por “bloquear parcial o totalmente”, respectivamente, un canal iónico por un compuesto quiere decirse que la modulación del canal iónico por la secuencia de inmunoglobulina o polipéptido da como resultado un flujo reducido de iones a través del canal (es decir, en comparación con el flujo de iones a través del canal iónico cuando no hay interacción entre la secuencia de inmunoglobulina/polipéptido y el canal iónico, tal como se determina mediante un ensayo adecuado, tal como los descritos en el presente documento) o esencialmente sin flujo de iones a través del canal, respectivamente, independientemente del mecanismo específico por medio del cual el canal iónico se bloquea por la secuencia de inmunoglobulina o polipéptido. Por ejemplo, y sin limitación, la secuencia de inmunoglobulina o polipéptido puede bloquear parcial o totalmente el canal iónico directamente uniéndose a un epítipo del canal iónico (o de al menos una subunidad del mismo) de modo que el flujo de iones a través del canal se bloquea total o parcialmente (por ejemplo, mediante impedimento estérico o interacciones estéricas); o indirectamente, por ejemplo por medio de interacción con una o más partes, regiones, dominio o bucles extracelulares del canal iónico o afectando la(s) (posible(s)) confirmación/confirmaciones del canal iónico, o limitando el grado y/o velocidad con la que el canal iónico puede experimentar cambios conformacionales.

Una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación que es un bloqueante de un canal iónico es preferiblemente tal que reduce el flujo de iones a través del canal en al menos un 1%, preferiblemente al menos un 5%, tal como al menos un 10%, por ejemplo un 25% o más o incluso un 50% o más y hasta un 75% o incluso más de un 90% o más, en comparación con el flujo de iones a través del canal iónico cuando no hay interacción entre la secuencia de inmunoglobulina/polipéptido y el canal iónico, tal como se determina mediante un ensayo adecuado, tal como los descritos en el presente documento.

Una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación que es un abridor de un canal iónico es preferiblemente tal que aumenta el flujo de iones a través del canal en al menos un 1%, preferiblemente al menos un 5%, tal como al menos un 10%, por ejemplo un 25% o más o incluso un 50% o más y hasta un 75% o incluso más de un 90% o más, en comparación con el flujo de iones a través del canal iónico cuando no hay interacción entre la secuencia de inmunoglobulina/polipéptido y el canal iónico, tal como se determina mediante un ensayo adecuado, tal como los descritos en el presente documento.

Una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación que es un agonista de un canal iónico y/o de la(s) función/funciones o respuesta(s) biológica(s) asociada(s) con el mismo es preferiblemente tal que aumenta la función o respuesta biológica deseada en al menos un 1%, preferiblemente al menos un 5%, tal como al menos un 10%, por ejemplo un 25% o más o incluso un 50% o más y hasta un 75% o incluso más de un 90% o más, en comparación con la función o respuesta biológica cuando no hay interacción entre la secuencia de inmunoglobulina/polipéptido y el canal iónico, tal como se determina mediante un ensayo adecuado, tal como los descritos en el presente documento.

Una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación que es un antagonista de un canal iónico y/o de la(s) función/funciones o respuesta(s) biológica(s) asociada(s) con el mismo es preferiblemente tal que disminuye la función o respuesta biológica deseada en al menos un 1%, preferiblemente al menos un 5%, tal como al menos un 10%, por ejemplo un 25% o más o incluso un 50% o más y hasta un 75% o incluso más de un 90% o más, en comparación con la función o respuesta biológica cuando no hay interacción entre la secuencia de inmunoglobulina/polipéptido y el canal iónico, tal como se determina mediante un ensayo adecuado, tal como los descritos en el presente documento.

Secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos de la divulgación que son bloqueantes o abridores de canales iónicos (o potencian bloqueantes o abridores) y/o que son agonistas o antagonistas de canales iónicos o la(s) función/funciones o respuesta(s) biológica(s) asociada(s) con los mismos pueden proporcionar su actividad deseada de manera irreversible, pero preferiblemente lo hacen de manera reversible.

La presente invención, en su sentido más amplio, no está tampoco particularmente limitada a o definida por un

determinante, epítipo, parte, dominio, subunidad o confirmación específica (cuando sea aplicable) de canales iónicos contra los cuales se dirigen las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación.

Las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden dirigirse contra cualquier canal iónico deseado, y pueden dirigirse en particular contra un canal iónico que tiene al menos un dominio extracelular. Más en particular, pero sin limitación, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden dirigirse contra cualquier canal iónico deseado que tenga al menos un dominio transmembrana, más en particular al menos dos dominios transmembrana, tal como al menos cuatro dominios transmembrana (por ejemplo, los canales iónicos 4-TM) o seis o más dominios transmembrana (por ejemplo, los canales iónicos 6-TM). Los ejemplos de tales canales iónicos resultarán evidentes para el experto basándose en la técnica anterior citada en el presente documento. Se hace referencia, por ejemplo, a las revisiones de Goldstein *et al.*, Yu *et al.*, Clapham y Garbers, Hoffmann *et al.*, Kubo *et al.*, Wei *et al.*, Shieh *et al.* (véase, por ejemplo, la figura 2 en la página 559), Catterall *et al.*, Gutman *et al.*, Clapham *et al.*, Catterall *et al.* citadas anteriormente. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden, por ejemplo, dirigirse contra las partes extracelulares de tales dominios transmembrana y en particular contra los bucles/repeticiones extracelulares que conectan tales dominios transmembrana (por ejemplo, se hace referencia de nuevo a la figura 2 en la página 559 de Shieh *et al.* y a la figura 1 en la página 1290 de Xu *et al.*, citado anteriormente, que muestran esquemáticamente tales bucles extracelulares de canales iónicos 2-TM, 4-TM y 6-TM).

En un aspecto preferido, pero no limitativo, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación se dirigen contra canales iónicos 6-TM (tal como, sin limitación, los canales iónicos Kv mencionados anteriormente (por ejemplo, desde Kv1.1 hasta Kv9.3, los canales iónicos KvLQT, Slo y IKCa10), y en particular contra uno de los bucles/repeticiones extracelulares que conectan los dominios transmembrana de tales canales iónicos 6-TM, tales como el bucle E1, E2, y en particular E3, o la región entre S5 y S6 de las repeticiones 2, 3 y 4.

Sin embargo, según un aspecto específico de la invención, una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación puede dirigirse contra (tal como se define en el presente documento) un canal iónico que se expresa sobre la superficie de una célula y/o contra al menos una región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico.

En particular, según este aspecto, una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación se dirige contra (tal como se define en el presente documento) al menos una región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico; y es preferiblemente además tal que dicha secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación es capaz de modular (tal como se define en el presente documento) dicho canal iónico. Más en particular, según este aspecto, una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación se dirige contra (tal como se define en el presente documento) al menos una región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico; y es preferiblemente además tal que dicha secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación es capaz de bloquear (total o parcialmente) dicho canal iónico.

Según este aspecto de la invención, la secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación puede dirigirse contra cualquier parte, región, dominio, bucle extracelular adecuado u otro epítipo extracelular, pero se dirige preferiblemente contra una de las partes extracelulares de los dominios transmembrana o más preferiblemente contra uno de los bucles extracelulares que unen los dominios transmembrana. Más en particular, cuando el canal iónico es un canal 6-TM, la proteína o polipéptido (y en particular al menos una de las secuencias de inmunoglobulina presentes en el mismo) puede dirigirse contra el bucle E3 extracelular que une los dominios transmembrana (y/o puede haberse producido contra el bucle E3 extracelular y/o contra péptidos sintéticos o semisintéticos que derivan de o se basan en la secuencia del bucle E3 extracelular). Otras partes, regiones, dominios, bucles o epítipos extracelulares adecuados pueden derivarse mediante análisis Kyte-Doolittle de la secuencia de inmunoglobulina del canal iónico pertinente; alineando canales iónicos que pertenecen a las mismas (sub)familias e identificando los diversos dominios transmembrana y partes, regiones, dominio o bucles extracelulares (incluyendo el bucle E3); mediante análisis TMAP; o mediante cualquier combinación adecuada de los mismos. La divulgación también se refiere a secuencias de inmunoglobulina y (tal como se define además en el presente documento) que se dirigen contra tales partes, regiones, dominios, bucles o epítipos extracelulares (y/o que se han producido contra partes o fragmentos de la secuencia de inmunoglobulina que comprende tales partes, regiones, dominios, bucles o epítipos extracelulares y/o contra péptidos sintéticos o semisintéticos que derivan de o se basan en tales partes, regiones, dominios, bucles o epítipos extracelulares).

En particular, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación son preferiblemente tales que:

- se unen a una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico (tal como se describe en el presente documento) 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} litro/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litro/moles); .

y/o de modo que:

- se unen a una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico (tal como se describe en el presente documento) con una velocidad k_{on} de entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;

y/o de modo que:

- se unen a una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico (tal como se describe en el presente documento) con una velocidad k_{off} entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ 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} .

Preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina monovalente de la divulgación (o un polipéptido que contiene sólo una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) es preferiblemente tal que se unirá a una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico (tal como se describe en el presente documento) con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM.

Algunos valores de CI_{50} preferidos para la unión de las secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos de la divulgación para unirse a una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico (tal como se describe en el presente documento) resultarán evidentes a partir de la descripción adicional y ejemplos en el presente documento.

Además, según este aspecto, cualquier polipéptido de la divulgación multivalente o multiespecífico (tal como se define en el presente documento) también puede dirigirse adecuadamente contra dos o más partes, regiones, dominios, bucles extracelulares diferentes u otros epítopos extracelulares en el mismo antígeno, por ejemplo contra dos bucles extracelulares diferentes, contra dos partes extracelulares diferentes de los dominios transmembrana o contra unos bucles extracelulares y un bucle extracelular. Tales polipéptidos de la divulgación multivalentes o multiespecíficos también pueden tener (o estar modificados por ingeniería genética y/o seleccionarse para) avidez aumentada y/o selectividad mejorada para el canal iónico deseado, y/o para cualquier otra combinación o propiedad deseada de propiedades deseadas que pueden obtenerse mediante el uso de tales polipéptidos multivalentes o multiespecíficos.

Una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación también puede decirse que "se dirige contra" (tal como se define además en el presente documento) un antígeno peptídico cuando se dirige contra dicho antígeno peptídico *per se*, por ejemplo en un ensayo convencional para determinar la unión (es decir, la especificidad, afinidad, K_D , K_A , k_{on} o k_{off} de tal unión; todo tal como se describe en el presente documento) de la secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación contra el antígeno peptídico, usando el antígeno peptídico de la divulgación como tal (en lugar de, por ejemplo, el antígeno peptídico como parte de una mayor proteína o polipéptido, por ejemplo como parte de un canal iónico presente sobre la superficie de una célula). Las técnicas para determinar la unión de secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos a pequeños péptidos serán evidentes para el experto, y por ejemplo, incluyen las técnicas descritas en el presente documento.

Una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación también puede decirse que "se dirige contra" (tal como se define además en el presente documento) un antígeno peptídico cuando se ha examinado contra, seleccionado usando y/o producido contra (es decir, inmunizando de manera adecuada un mamífero, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) dicho antígeno peptídico. Las técnicas para producir secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación contra un antígeno peptídico de la divulgación, y para examinar o seleccionar secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación para la unión contra un antígeno peptídico de la divulgación, serán evidentes para el experto, por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en el presente documento.

Generalmente, se espera que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación que se dirigen contra un antígeno peptídico de la divulgación *per se*, y/o que se han examinado contra, seleccionado usando y/o producido contra un antígeno peptídico de la invención, también podrán unirse (y en particular, unirse específicamente, tal como se define en el presente documento) a un antígeno peptídico de la divulgación que forma parte de un canal iónico (o al menos una subunidad del mismo) que está presente sobre la superficie de una célula. Por tanto, los antígenos peptídicos de la divulgación pueden encontrar uso particular en métodos para generar secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación (tal como se define en el presente documento); y tales métodos y usos forman aspectos adicionales de la divulgación.

Por ejemplo, un método de este tipo puede comprender una de las siguientes etapas o una combinación adecuada de ambas de las siguientes etapas:

a) una etapa de inmunizar adecuadamente un camélido con un antígeno adecuado que comprende la parte, región,

dominio, bucle extracelular deseada u otro(s) epítipo(s) extracelular(es), de modo que se produce una respuesta inmunitaria contra la parte, región, dominio, bucle extracelular deseada u otros epítipo(s) extracelular(es). El antígeno puede ser cualquier antígeno adecuado que es capaz de producir una respuesta inmunitaria contra la parte, región, dominio, bucle extracelular deseada u otro(s) epítipo(s) extracelular(es); tal como, por ejemplo y sin limitación, células completas que tienen la parte, región, dominio, bucle extracelular deseada u otro(s) epítipo(s) extracelular(es) sobre su superficie, fragmentos de la pared celular del mismo o cualquier otra preparación adecuada derivada de tales células, vesículas que tienen la parte, región, dominio, bucle extracelular deseada u otro(s) epítipo(s) extracelular(es) sobre su superficie, una subunidad o fragmento de una subunidad de un canal iónico que comprende la parte, región, dominio, bucle extracelular deseada u otro(s) epítipo(s) extracelular(es), o un péptido sintético o semisintético que comprende y/o se basa en (la secuencia de inmunoglobulina de) la parte, región, dominio, bucle extracelular deseada u otro(s) epítipo(s) extracelular(es);

y/o

b) una etapa de examen de la afinidad y/o unión para la parte, región, dominio, bucle extracelular deseada u otro(s) epítipo(s) extracelular(es). Esto puede, por ejemplo, realizarse seleccionando un conjunto, colección o biblioteca de células que expresan anticuerpos de cadena pesada sobre su superficie (por ejemplo, células B obtenidas de un camélido inmunizado adecuadamente), mediante examen de una biblioteca (sin exposición previa o inmunitaria) de secuencias de V_{HH} o secuencias de Nanobody, o mediante examen de una biblioteca (sin exposición previa o inmunitaria) de secuencias de ácido nucleico que codifican para secuencias de V_{HH} o secuencias de Nanobody; que pueden realizarse de manera conocida *per se*, para las que se hace referencia a la divulgación adicional y técnica anterior mencionadas en el presente documento;

y cuyo método puede comprender además opcionalmente una o más de otras etapas adecuadas conocidas *per se*, tal como, por ejemplo y sin limitación, una etapa de maduración de afinidad, una etapa de expresión de la secuencia de inmunoglobulina deseada, una etapa de examen de la unión y/o para la actividad contra el antígeno deseado (en este caso, el canal iónico), una etapa de determinación de la secuencia de inmunoglobulina deseada o secuencia de nucleótidos, una etapa de introducción de una o más sustituciones humanizantes (por ejemplo, tal como se describe adicionalmente en el presente documento), una etapa de formateo en un formato multivalente y/o multiespecífico adecuado, una etapa de selección de las propiedades biológicas y/o fisiológicas deseadas (es decir, usando un ensayo adecuado, tal como los descritos en el presente documento); y/o cualquier combinación adecuada de una o más de tales etapas, en cualquier orden adecuado.

Tales métodos y las secuencias de inmunoglobulina obtenidas por medio de tales métodos, así como proteínas y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en los mismos, forman aspectos adicionales de esta divulgación.

En una realización preferida, la secuencia de inmunoglobulina o polipéptido de la divulgación es una secuencia de inmunoglobulina o polipéptido "monoclonal", por lo que quiere decirse que al menos cada una de la una o más secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra el canal iónico que están presentes en dicha proteína o polipéptido (y preferiblemente todas las secuencias de inmunoglobulina que están presentes en dicha proteína o polipéptido) son "monoclonales" tal como entiende comúnmente el experto. A este respecto, debe sin embargo indicarse que, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la presente divulgación cubre explícitamente proteínas multivalentes o multiespecíficas que comprenden dos o más secuencias de inmunoglobulina (y en particular secuencias de inmunoglobulina monoclonal) que se dirigen contra diferentes partes, regiones, dominios, bucles o epítopos del mismo canal iónico, y en particular contra diferentes partes, regiones, dominios, bucles o epítopos extracelulares del mismo canal iónico.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de inmunoglobulina de la invención, o de al menos una parte, fragmento, análogo, variante o derivado de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación, en la que dicha proteína o polipéptido es capaz de modular (tal como se define en el presente documento) un canal iónico. Preferiblemente, dicha proteína o polipéptido es capaz de bloquear total o parcialmente (tal como se define en el presente documento) un canal iónico.

La proteína o polipéptidos descritos en el presente documento se dirigen preferiblemente contra un canal iónico que se expresa sobre la superficie de una célula y/o contra al menos una región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico, más preferiblemente contra al menos un bucle extracelular de un canal iónico. En un aspecto específico, cuando el canal iónico es un canal iónico con seis dominios transmembrana (6-TM), la proteína o polipéptido se dirige preferiblemente contra el bucle E3 extracelular. Las proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento también pueden dirigirse contra un antígeno peptídico de la divulgación.

En un aspecto específico, la divulgación se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en al menos una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación, o de al menos una parte, fragmento, análogo, variante o derivado de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación, en la que al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de divulgación (o al menos una de las partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) presentes en la proteína o polipéptido

se dirige contra un canal iónico. Preferiblemente, al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o al menos una de las partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) presentes en la proteína o polipéptido es capaz de modular un canal iónico, y más preferiblemente de bloquear total o parcialmente un canal iónico. Además, preferiblemente, al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o al menos una de las partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) presentes en la proteína o polipéptido se dirige contra al menos una región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico, y en particular contra un bucle extracelular de un canal iónico. En un aspecto específico, cuando el canal iónico es un canal iónico con seis dominios transmembrana (6-TM), al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación presentes en la proteína o polipéptido se dirige preferiblemente contra el bucle E3 extracelular.

Las proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender o consistir esencialmente en una única secuencia de inmunoglobulina de la divulgación (o parte, fragmento, análogo, variante o derivado de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación), o alternatively de al menos dos (tal como dos, tres, cuatro o más) secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación), que se unen adecuadamente de manera opcional por medio de uno o más ligadores adecuados (tal como se describe en el presente documento). Ejemplos adecuados de tales ligadores resultarán evidentes para el experto en la técnica, por ejemplo basándose en la divulgación adicional en el presente documento. En un aspecto de la divulgación, cuando una proteína o polipéptido comprende al menos dos secuencias de inmunoglobulina de la divulgación, al menos dos de las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) presentes en la proteína o polipéptido se dirigen contra el mismo canal iónico. Por ejemplo, al menos dos de las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) presentes en la proteína o polipéptido pueden dirigirse contra diferentes regiones, dominios, bucles extracelulares u otros epítopos extracelulares del mismo canal iónico. Sin embargo, preferiblemente al menos una (o al menos dos) de las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) presentes en la proteína o polipéptido se dirigen contra al menos un bucle extracelular de el canal iónico.

Cuando una proteína o polipéptido de la divulgación comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación), puede comprender al menos dos secuencias de inmunoglobulina de la divulgación diferentes (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación), y/o comprender al menos dos secuencias de inmunoglobulina idénticas de la divulgación (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación).

En un aspecto específico, cuando una proteína o polipéptido de la divulgación comprende o consiste esencialmente en al menos dos secuencias de inmunoglobulina de la divulgación (o partes, fragmentos, análogos, variantes o derivados de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación), puede comprender al menos una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación (o parte, fragmento, análogo, variante o derivado de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación) que se dirige contra una proteína, polipéptido u otro antígeno diferente de un canal iónico.

En otro aspecto, la invención se refiere a una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación, o parte, fragmento, análogo, variante o derivado de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación que es capaz de modular un canal iónico. Preferiblemente, dicha secuencia de inmunoglobulina de la divulgación es capaz de bloquear total o parcialmente (tal como se define en el presente documento) un canal iónico.

Las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación descritas en el presente documento se dirigen preferiblemente contra al menos una región, dominio, bucle extracelular u otro epítipo extracelular de un canal iónico, más preferiblemente contra al menos un bucle extracelular de un canal iónico. En un aspecto específico, cuando el canal iónico es un canal iónico con seis dominios transmembrana (6-TM), la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación se dirige preferiblemente contra el bucle E3 extracelular.

También está dentro del alcance de la divulgación que, cuando sea aplicable, una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación pueda unirse a dos o más determinantes, epítopos, partes, dominios, subunidades o confirmaciones antigénicas de canales iónicos. En tal caso, las determinantes, epítopos, partes, dominios o subunidades antigénicas de canales iónicos a los que las secuencias de inmunoglobulina y/o polipéptidos de la divulgación se unen pueden ser esencialmente los mismos (por ejemplo, si los canales iónicos contienen motivos estructurales repetidos o se producen de forma multimérica) o pueden ser diferentes (y en el último caso, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden unirse a tales determinantes, epítopos, partes, dominios, subunidades antigénicas diferentes de canales iónicos con una afinidad y/o especificidad que puede ser la misma o diferente). Además, por ejemplo, cuando existen canales iónicos en una conformación activada y en una conformación inactiva, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden unirse o bien a una de estas

confirmaciones, o bien unirse a ambas de estas confirmaciones (es decir, con una afinidad y/o especificidad que puede ser la misma o diferente). Además, por ejemplo, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden unirse a una conformación de canales iónicos en los que se unen a un ligando pertinente, pueden unirse a una conformación de canales iónicos en la que no se unen a un ligando pertinente, o pueden unirse a ambas de tales conformaciones (de nuevo con una afinidad y/o especificidad que puede ser la misma o diferente).

También se espera que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación se unirán generalmente a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos sintéticos o que se producen de manera natural de canales iónicos; o al menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de canales iónicos que contienen una o más determinantes antigénicos o epítomos que son esencialmente los mismos que el/los determinante(s) o epítomo(s) antigénico(s) a los que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación se unen en canales iónicos (por ejemplo, en canales iónicos de tipo natural). De nuevo, en tal caso, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden unirse a tales análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que son las mismas que, o que son diferentes de (es decir, mayores que o menores que), la afinidad y especificidad con la que las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación se unen a canales iónicos (de tipo natural). También se incluye dentro del alcance de la divulgación que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación se unen a algunos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de canales iónicos, pero no a otros.

Cuando existen canales iónicos en forma monomérica y en una o más formas multiméricas, está dentro del alcance de la invención que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación sólo se unan a canales iónicos en forma monomérica, sólo se unan a canales iónicos en forma multimérica, o se unan a tanto la forma monomérica como la forma multimérica. De nuevo, en tal caso, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden unirse a la forma monomérica con una afinidad y/o especificidad que son las mismas que, o que son diferentes de (es decir, mayores que o menores que), la afinidad y especificidad con la que las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación se unen a la forma multimérica.

Además, cuando los canales iónicos pueden asociarse con otras proteínas o polipéptidos para formar complejos proteicos (por ejemplo, con múltiples subunidades), está dentro del alcance de la invención que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención se unan a canales iónicos en su estado no asociado, se unan a canales iónicos en su estado asociado, o se unan a ambos. En todos estos casos, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación pueden unirse a tales multímeros o complejos proteicos asociados con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual o diferente de (es decir, mayor que o menor que) la afinidad y/o especificidad con la que las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación se unen a canales iónicos en su estado monomérico y no asociado.

Además, tal como será evidente para el experto, proteínas o polipéptidos que contienen dos o más secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra canales iónicos pueden unirse con mayor avidez a canales iónicos que la(s) correspondiente(s) secuencia(s) de inmunoglobulina monomérica(s). Por ejemplo, y sin limitación, proteínas o polipéptidos que contienen dos o más secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra diferente epítomos de canales iónicos pueden (y habitualmente) se unirán con mayor avidez que cada uno de los diferentes monómeros, y proteínas o polipéptidos que contienen dos o más secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra canales iónicos pueden (y habitualmente) se unirán también con mayor avidez a un multímero de canales iónicos.

Generalmente, las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación se unirán al menos a aquellas formas de canales iónicos (incluyendo formas monoméricas, multiméricas y asociadas) que son las más relevantes desde un punto de vista biológico y/o terapéutico, tal como será evidente para el experto. También está dentro del alcance de la divulgación usar partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de las secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos de la divulgación, y/o usar proteínas o polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en una o más de tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados, siempre que estos sean adecuados para los usos previstos en el presente documento. Tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados contendrán habitualmente (al menos parte de) un sitio de unión a antígeno funcional para la unión contra canales iónicos; y más preferiblemente serán capaces de unirse específicamente a canales iónicos, e incluso más preferiblemente capaces de unirse a canales iónicos con una afinidad (medida y/o expresada adecuadamente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off} , o alternativamente como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento. Algunos ejemplos no limitativos de tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos, derivados, proteínas y/o polipéptidos resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento. También pueden proporcionarse fragmentos o polipéptidos adicionales de la divulgación combinando de manera adecuada (es decir, uniendo o mediante fusión genética) una o más partes o fragmentos (más pequeños) tal como se describe en el presente documento.

En un aspecto específico, pero no limitativo de la divulgación que se describirá adicionalmente en el presente documento, tales análogos, mutantes, variantes, alelos, derivados tienen una semivida aumentada en suero (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) en comparación con la secuencia de inmunoglobulina

de la cual han derivado. Por ejemplo, una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación puede unirse (químicamente o de otro modo) a uno o más grupos o restos que extienden la semivida (tal como PEG), para proporcionar un derivado de una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación con semivida aumentada.

En un aspecto específico, pero no limitativo, la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación puede ser una secuencia de inmunoglobulina que comprende un pliegue de inmunoglobulina o puede ser una secuencia de inmunoglobulina que, en condiciones adecuadas (tales como condiciones fisiológicas) es capaz de formar un pliegue de inmunoglobulina (es decir, plegamiento). Se hace referencia entre otros a la revisión de Halaby *et al.*, J. (1999) Protein Eng. 12, 563-71. Preferiblemente, cuando se pliega adecuadamente para formar un pliegue de inmunoglobulina, una secuencia de inmunoglobulina de este tipo es capaz de unirse específicamente (tal como se define en el presente documento) a canales iónicos; y más preferiblemente, es capaz de unirse a canales iónicos con una afinidad (medida y/o expresada adecuadamente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off} , o alternativamente como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento. Además, partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de tales secuencias de inmunoglobulina son preferiblemente tales que comprenden un pliegue de inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un pliegue de inmunoglobulina.

En particular, pero sin limitación, las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación pueden ser secuencias de inmunoglobulina que consisten esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de una secuencia de inmunoglobulina de este tipo (que entonces contendrá habitualmente al menos algunos de los residuos de aminoácido que forman al menos una de las CDR, tal como se describe adicionalmente en el presente documento).

En una secuencia de inmunoglobulina de la divulgación de este tipo, las secuencias de región de entramado pueden ser cualquier secuencia de región de entramado adecuada, y ejemplos de secuencias de región de entramado adecuadas serán evidentes para el experto, por ejemplo basándose en los manuales convencionales y la divulgación adicional y técnica anterior mencionadas en el presente documento.

Las secuencias de región de entramado son preferiblemente (una combinación adecuada de) secuencias de región de entramado de inmunoglobulina o secuencias de región de entramado que han derivado de secuencias de región de entramado de inmunoglobulina (por ejemplo, mediante humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias de región de entramado pueden ser secuencias de región de entramado derivadas de un dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia de V_L) y/o de un dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia de V_H). En un aspecto particularmente preferido, las secuencias de región de entramado son o bien secuencias de región de entramado que han derivado de una secuencia de V_{HH} (en la que dichas secuencias de región de entramado pueden haberse humanizado parcial o completamente) o son secuencias de V_H convencionales que se han camelizado (tal como se define en el presente documento).

Las secuencias de región de entramado son preferiblemente tales que la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación es una secuencia de V_{HH} . De nuevo, secuencias de región de entramado adecuadas serán evidentes para el experto, por ejemplo basándose en los manuales convencionales y la divulgación adicional y técnica anterior mencionadas en el presente documento.

En particular, las secuencias de región de entramado presentes en las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación pueden contener uno o más residuos distintivos (tal como se define en el presente documento), de modo que la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación es un Nanobody™. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de (combinaciones adecuadas de) tales secuencias de región de entramado resultarán evidentes a partir de la divulgación adicional en el presente documento.

De nuevo, tal como se describe generalmente en el presente documento para las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación, también es posible usar fragmentos adecuados (o combinaciones de fragmentos) de cualquiera de lo anterior, tales como fragmentos que contienen una o más secuencias de CDR, flanqueados y/o unidos adecuadamente por medio de una o más secuencias de región de entramado (por ejemplo, en el mismo orden que estas CDR y las secuencias de región de entramado pueden producirse en la secuencia de inmunoglobulina de tamaño completo a partir de la cual ha derivado el fragmento). Tales fragmentos también pueden ser de nuevo tales que comprenden o pueden formar un pliegue de inmunoglobulina, o alternativamente ser tales que no comprenden o no pueden formar un pliegue de inmunoglobulina.

En un aspecto específico, un fragmento de este tipo comprende una única secuencia de CDR tal como se describe en el presente documento (y en particular una secuencia de CDR3), que está flanqueada en cada lado por (parte de) una secuencia de región de entramado (y en particular, parte de la(s) secuencia(s) de región de entramado que, en la secuencia de inmunoglobulina de la que deriva el fragmento, son adyacentes a dicha secuencia de CDR. Por ejemplo, una secuencia de CDR3 puede estar precedida por (parte de) una secuencia de FR3 y seguida por (parte de) una secuencia de FR4). Un fragmento de este tipo también puede contener un puente disulfuro, y en particular

un puente disulfuro que une las dos regiones de entramado que preceden y siguen la secuencia de CDR, respectivamente (para el propósito de formar un puente disulfuro de este tipo, pueden usarse residuos de cisteína que se producen de manera natural en dichas regiones de entramado, o alternatively pueden añadirse sintéticamente residuos de cisteína a o introducirse en dichas regiones de entramado). Para una descripción adicional de estos "fragmentos facilitados", se hace referencia de nuevo al documento WO 03/050531, así como al documento WO 2009/127691.

Las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación pueden ser, en particular, una secuencia de inmunoglobulina o un fragmento adecuado de la misma, y la denominada secuencia de V_{HH} (tal como se define en el presente documento) que deriva de un denominado "anticuerpo de cadena pesada" (tal como se define en el presente documento).

Por tanto, las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación pueden ser secuencias de inmunoglobulina que se producen de manera natural (de cualquier especie adecuada) o secuencias de inmunoglobulina sintéticas o semisintéticas. En un aspecto específico pero no limitativo de la divulgación, la secuencia de inmunoglobulina es una secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética, que incluye pero no se limita a secuencias de inmunoglobulina "humanizadas" (tal como se define en el presente documento) (tal como secuencias de V_{HH} o Nanobodies parcial o totalmente humanizados), así como secuencias de inmunoglobulina que se han obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad (por ejemplo, a partir de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o que se producen de manera natural), injerto de CDR, remodelación de superficie, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje de PCR usando cebadores solapantes, y técnicas similares para modificación por ingeniería genética de secuencias de inmunoglobulina bien conocidas para el experto; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de lo anterior. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, así como a la descripción adicional y técnica anterior mencionadas en el presente documento.

De manera similar, las secuencias de nucleótidos de la divulgación pueden ser secuencias de nucleótidos que se producen de manera natural o secuencias sintéticas o semisintéticas, y pueden, por ejemplo, ser secuencias que se aíslan mediante PCR a partir de un molde que se produce de manera natural adecuado (por ejemplo, ADN o ARN aislados de una célula), secuencias de nucleótidos que se han aislado de una biblioteca (y en particular, una biblioteca de expresión), secuencias de nucleótidos que se han preparado introduciendo mutaciones en una secuencia de nucleótidos que se produce de manera natural (usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*, tal como PCR de apareamiento erróneo), secuencias de nucleótidos que se han preparado mediante PCR usando cebadores solapantes, o secuencias de nucleótidos que se han preparado usando técnicas para síntesis de ADN conocidas *per se*.

En particular, la secuencia de inmunoglobulina de la divulgación puede ser un Nanobody™ (tal como se define en el presente documento) o un fragmento adecuado del mismo. [Nota: Nanobody™, Nanobodies™ y Nanoclone™ son marcas comerciales de Ab/ynx N.V.] Tales Nanobodies dirigidos contra canales iónicos también se denominarán en el presente documento "Nanobodies de la divulgación". Para una descripción general de Nanobodies, se hace referencia a la descripción adicional a continuación, así como a la técnica anterior citada en el presente documento. A este respecto, debe sin embargo indicarse que esta descripción y la técnica anterior describieron principalmente Nanobodies de la denominada "clase V_{H3} " (es decir, Nanobodies con un alto grado de homología de secuencia con secuencias de línea germinal humanas de la clase V_{H3} tales como DP-47, DP-51 o DP-29), cuyos Nanobodies forman un aspecto preferido de esta divulgación. Sin embargo, debe indicarse que la divulgación en su sentido más amplio cubre generalmente cualquier tipo de Nanobody dirigido contra canales iónicos, y por ejemplo también cubre los Nanobodies que pertenecen a la denominada "clase V_{H4} " (es decir, Nanobodies con un alto grado de homología de secuencia con secuencias de línea germinal humanas de la clase V_{H4} tales como DP-78), como, por ejemplo se describe en la solicitud provisional estadounidense 60/792.279 de Ablynx N.V. titulada "DP-78-like Nanobodies" presentada el 14 de abril de 2006.

Generalmente, los Nanobodies (en particular secuencias de V_{HH} y Nanobodies parcialmente humanizados) pueden en particular caracterizarse por la presencia de uno o más "residuos distintivos" (tal como se describe en el presente documento) en una o más de las secuencias de región de entramado (de nuevo tal como se describe adicionalmente en el presente documento). Por tanto, generalmente, un Nanobody puede definirse como una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

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

En particular, un Nanobody puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que las secuencias de región de entramado son tal como se definen además en el presente documento.

En particular, un Nanobody puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que las secuencias de región de entramado son tal como se definen además en el presente documento.

Más en particular, un Nanobody puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

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

i) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2 a continuación;

y en la que:

ii) dicha secuencia de inmunoglobulina tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 1 a 22, en la que para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, se descartan los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR (indicadas con X en las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 22).

En estos Nanobodies, las secuencias de CDR son generalmente tal como se define además en el presente documento.

Por tanto, la divulgación también se refiere a tales Nanobodies que pueden unirse (tal como se define en el presente documento) y/o se dirigen contra un canal iónico, a fragmentos adecuados de los mismos, así como a polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más de tales Nanobodies y/o fragmentos adecuados.

SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780 (véase la tabla A-1) proporcionan las secuencias de inmunoglobulina de varias secuencias de V_{HH} que se han producido contra un canal iónico.

Tabla A-1: secuencias de VHH preferidas o secuencias de Nanobody (también referido aquí como una secuencia con un nombre particular o SEQ ID NO: X, donde X es un número que se refiere a la secuencia de inmunoglobulina relevante):

Nombre	SEQ ID NO: X, en donde X =	Función de P2X7	Familia	SECUENCIA DE INMUNGLOBULINA
P2X7PMP2C4	705	aglutinante	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTSS
P2X7PMP2A6	706	Aglutinante	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLE PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTSS

P2X7PMP4D5	707	Aglutinante	1	EMQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP20E8	708	Aglutinante	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PGDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP16H8	709	Aglutinante	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRLTSSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP16B10	710	Aglutinante	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMDSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP4G6	711	aglutinante	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDVS SWGQGTQVTVSS
P2X7PMP1A8	712	Aglutinante	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREGVSILSSIGKT FYADSVKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PGDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGAQVTVSS
P2X7PMP1C9	713	Aglutinante	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREGVSILSSIGKT FYADSVKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PEDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGAQVTVSS
P2X7PMP20B10	714	Aglutinante	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREGVSILSSIGKT FYADSVKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PEDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGTQVTVSS
P2X7PMP20C9	715	Aglutinante	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREGVSILSSIGKT FYADSAKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PEDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGTQVTVSS

P2X7PMP5A1	716	Aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRLTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS
P2X7PMP5B1	717	aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYRGQGTQV TVSS
P2X7PMP11G1	718	Aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRRAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS
P2X7PMP11A1	719	Aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSVGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGTP RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS
P2X7PMP7E2	720	Aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS
P2X7PMP5F1	721	Aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS
P2X7PMP7F3	722	Aglutinante	3	EVQLVESRGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKSRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS
P2X7PMP13B2	723	aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS
P2X7PMP11D3	724	Aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSG LPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS

P2X7PMP7F1	725	Aglutinante	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNASTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP4B4	726	Potenciador	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKLREFVASINWSGI YTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMNN LKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPSS YDFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP19A7	727	Potenciador	4	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKLREFVASINWSGI YTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMNN LRAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPSS YDFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP19A8	728	Potenciador	4	EVQLMESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TVSDYGMGWFRQAPGKLREFVASINWS GIYTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMN NLKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPS SYDFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP19D12	729	Potenciador	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKLREFVASINWSGI YTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMNN LKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPSS YGFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP20B8	730	Potenciador	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKECEFVASINWSG TYTRYIDSVEGRFTISRDNENTLYLQMN NLKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSYDGRPS SYDFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP4G4	731	Potenciador	4	EVQLMESGGGLVQAGGPLRLSCAASGR TVSDYGMGWFRQAPGKEREFVASINWS GTYTRYIDSVEGRFTISRDNENTLYLQM NNLKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSYDGRP SSYDFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP8G11	732	Bloqueador	5,1	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LRPEDTAAYCYAVIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS

P2X7PMP6A11	733	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LKPEDTAAYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP8E6	734	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LKPEDTAAYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP12A11	735	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYCYARIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP14F6	736	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYCYARIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8B4	737	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNS LKPEDTAAYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP14G4	738	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LKPEDTAAYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP8H5	739	Bloqueador	5,2	EMQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGN FFRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAAYCYARIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP14F10	740	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYSCYARIELGILEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP8A11	741	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMD GLKPEDTAVYCYARIELGVLVPRDYWG QGTQVTVSS

P2X7PMP8H6	742	Bloqueador	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYARIELGPLVPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8F5	743	Bloqueador	5,2	EVQLVKSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYARIELGPLVPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8G12	744	Bloqueador	5,3	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGPQKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8B12	745	Bloqueador	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNVMAWYRQGPQKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP14G11	746	Bloqueador	5,3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGPQKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8C12	747	Bloqueador	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8H10	748	Bloqueador	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGPQKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8D10	749	Bloqueador	5,3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8H4	750	Bloqueador	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGPQKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMD GLKPEDTAVYYCYATIELGVLPDYWG QGTQVTVSS

P2X7PMP18D12	751	Aglutinante	6	EVQLVESGGDLVQAGGSLKLSGVVSGVT FDDGTIGWFRQAPGKEREGIAISRVDGT TYYRDSVKGRFTVSSDSAKTTVNLQMNS LKPEDTAVYYCAADYASLCTIETGYGSLY DYWGRGTQVTVSS
P2X7PMP4B3	752	Aglutinante	6	EVQLVESGGDLVQAGGSLKLSGVVSGVT FDDGTIGWFRQAPGKEREGIAISRVDGT TYYRDSVKGRFTVSSDSAKTTVNLQMNS LKPEDTAVYYCAADYASLCTIETGYGSLY DYWGKGTQVTVSS
P2X7PMP8C7	753	Bloqueador parcial	7	EMQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFSSLAMGWLRLQAPGKEREFVSGISRGG TSTYYADSVKGRFTISRDNANTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAGSPVLSIVLDTRGLE YWGQGTQVTVSS
P2X7PMP8E7	754	Bloqueador parcial	7	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSLAMGWLRLQAPGKEREFVSGISRGGT STYYADSVKGRFTISRDNANTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAGSPVLSIVLDTRGLEY WGQGTQVTVSS
P2X7PMP6D7	755	Bloqueador parcial	7	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSLAMGWLRLQAPGKEREFVSGISRGGT STYYADSVKGRFTISRDNANTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAGSPVLSIVLDTRGLEY WGQGTQVTVSS
P2X7PMP7D6	756	Potenciador	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FGSSPVGWFRQAPGKERDFVATISWNG VDTHYLDVKGRFTISRDNANTVHLQM HILKPEDTALYYCAASTSGSVYLPYRVYQ YDSWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7E8	757	Potenciador	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSSPVGWFRQAPGKERDFVATISWNGV DTHYLDVKGRFTISRDNANTVHLQMHI LKPEDTALYYCAASTSGSAYLPYRVYQYD SWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7F5	758	Potenciador	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSSPVGWFRQAPGKERDFVATISWNGV DTHYLDVKGRFTISRDNANTVHLQMHI LKPEDTALYYCAASTSGSAYLPYRVHQY DSWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7F9	759	Aglutinante	9	EVQLVESGGGLVQAGASLRVSCAASART GSYTMGWFRQAPGKEREFVSTISWNGA STVYADSVKGRFTISRDNANTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAGSISSYSSRWQDDYE YWGQGTQVTVSS

P2X7PMP7A4	760	Aglutinante	9	EVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCAASART GSYSMGWFRQAPGKEREVSTISWNGA DTVYADSVKGRFTISRDNADTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAGSITSYVSTWQHDYE YWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7B4	761	Aglutinante	10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRN FGSYTMAWFRQAPGKGREFVSTINWSG GDTDYADSVKGRFTISRDNADNTVYLQM DSLKPEDTAVYYCAAGLEYMSTIRYTYEY WGQGTQVTVSS
P2X7PMP7H6	762	Bloqueador	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVWSGS MYRIDNMGWYRQAPGKQRELVA TVTRG DITNYADSVKGRFTIGRDNAKNTVYLQMN SLKPADTAVYYCNIDSYIIGAGVRDYGWR GTQVTVSS
P2X7PMP7G5	763	Potenciador	12	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAGSGFS YYIIGWFRQAPGKEREEVSCIRVTDGSTY YTNSVKGRFTMSRDNAENTVYLQMNSLK PEDTAVYSCATECQRWAYPNRIGARGQ GTQVTVSS
P2X7PMP13F4	764	Potenciador	12	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAGSGFS YYIIGWFRQAPGKEREEVSCIRVTDGSTY HTNSVKGRFTMSRDNAENTVYLQMNSLK PEDTAVYSCATECQRWAYPNRIGARGQ GTQVTVSS
P2X7PMP7D8	765	Aglutinante	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLT LEYYNIGWFRQAPGKEREGVACIDWTEG STFYVDSVKGRFTISTDNAKNTVYLHMNS LEPEDTAVYYCAAGWGRVITVQHMCADR SLFTSWGQGTQVTVSS
P2X7PMP13B8	766	Aglutinante	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLT LTYYNIGWFRQAPGKEREGVSCIDWTDG TTFYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLHLNS LEPEDTAVYYCAAGWGRVMTVQHMCAD RSLFTSWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7D5	767	Aglutinante	14	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRT FSSVAVGWFRQAPGKERDFVAWISWSG DSTYYADSVKGRFTASRDNVNNTVYLQM NSLKPEDTADYYCAA WKYDRASYDFPE AYDYWGQGTQVTVSS
P2X7PMP16D9	768	Aglutinante	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASPGT FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNADNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDVWGQGTQVTVSS

P2X7PMP1G6	769	Aglutinante	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASPGA FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDVWGQGTQVTVSS
P2X7PMP19E3	770	Aglutinante	15	EMQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASPGT FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDVWGQGTQVTVSS
P2X7PMP19C2	771	Aglutinante	15	EVQLVKSGGGLVQAGGSLRLSCAASPGT FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDVWGQGTQVTVSS
P2X7PMP6B7	772	Bloqueador parcial	16	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVSGR FSAMGWFRQAPGKEREFVATVGWNPMN SYYGDSVKGRFTIFRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAGSGSLDDVTSEAVYTD WGQGTQVTVSS
P2X7PMP14D5	773	Potenciador	17	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSP ISSYAMGWYRQAPGKPRELVARIYTG AWYEDSVKGRFTISRDNQNTVYLQMNS LKSEDTAVYYCHGRVRYDYWGQGTQVT VSS
P2X7PMP13G5	774	Aglutinante	18	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASDRT FGSSAMGWFRQAPGKDRDFVA AISWSG SSTHYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQM NSLKPADTAVYTCAASRRAYLPAKVGEY DFWGQGTQVTVSS
P2X7PMP13B5	775	Bloqueador parcial	19	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRT FSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISLSGS MTYYADSMKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA EELGDGLGYLAYRY DYWGQGTQVTVSS
P2X7PMP13F6	776	Aglutinante	20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSTNIMTWVRQAPGKLEWISTINSGGGT TTYADSVRGRFTISRDNKNMLYLQMSSL KPEDTALYYCITPRGVKGRGTQVTVSS
P2X7PMP13G4	777	Aglutinante	21	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASDRT FGSSTMGWFRQPPGKNREFVATIAWSAT TTHYADAVKGRFTVSRDNALNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAATLTWLG IHEY EYNTW GQGTQVTVSS

P2X7PMP13A7	778	Bloqueador	22	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCTASRFM LDYYDIGWFRQAPGKEREGVSCRFTNDG STAYADSVKGRFTISRDIKHTVYLQMNS LQPEDTAVYYCAAGPLTKRRQCVPGDFS MDFWGEGLTVTVSS
P2X7PMP13E9	779	Bloqueador	22	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCTASRFD LDYYDIAWFRQAPGKEREGVSCSFTNDG STYYADSVKGRFTMSRNDHRTVYLQMT SLQPEDTAVYTCAVGPLTRRRQCVPGDF SMDFWGEGLTVTVSS
P2X7PMP13G9	780	Bloqueador	23	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRT FSILTMGWFRQAPGKEREFVAAISGIGAIH YADSVKGRFTLSRDNARNTVSLHMNSLK PEDTAVYYCAAKANYESPSRETSYAYWG QGTQVTSS
P2X7PMP20H9	781	Aglutinante	24	EVQLVESGGRVMQTGGSLRLSCAASGH TFNDYSMGWFRQAPGKEFLAGINWSG MSTWYADSVKDRFTISRDNKNTVFLQM NSLEPGDTAVYYCAARQWISTIILTAPSQY DYWGQGTQVTSS
P2X7PMP20A11	782	Aglutinante	24	EVQLVESGGRVMQTGGSLRLSCAASGH TFNDYNMGWFRQAPGKEFLAGINWS GMSTWYADSVKDRFTISRDNKNTVFLQ MNSLEPGDTAVYYCAARQWISTIILTAPS QYDYWGQGTQVTSS
P2X7PMP18C1	783	Aglutinante	25	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVASGFA LEEHAIGWFRQAPGKEREGVSLSSYLGA AYYATSVKGRFTISRDNKNTVTLQMNSL KPEDTAVYYCARGHFTYDDGRITIRSVDY WGKGLTVTVSS
P2X7PMP18A7	784	Aglutinante	25	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVASGFA LEEHAIGWFRQAPGKEREGVSLSSYVGA VYYATSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCARGHFTYDDGRISIRSVDH WGKGLTVTVSS
P2X7PMP19H4	785	Aglutinante	26	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRT LSTAVMGWFRQAPGKERGLVAMISWSG SMTYYAKSVKGRFTISRDNKNTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAADMGGGPPDGDAM PRLSSGMDYWGKGLTVTVSS
P2X7PMP16G3	786	Aglutinante	27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGND FARFSIDAMGWYRQAPGKQRELVAVTTE DGTKNYADSVKGRATISRDDANNSMYLE MNTLKPEDTAVYYCKMGLIDGAAPYEF WGRGTQVTSS

P2X7PMP15C7	787	Aglutinante	28	EMQLVESGGGWVQAGGSLRLSCASSGS IFSAGAMGWYRQPAGKQRELVADITLGG STNYADSVKGRFTISRDNNAKNAVFLQMN SLKPEDTAVYYCNGLINTFARKIPRYAWG QGTQVTVSS
P2X7PMP16F5	788	Aglutinante	29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPT TFGRYTMGWFRQAPGREREFVAAISWIG GRYYYVDVVKGRFTISRDNNAKMMVYLQM NSLKPDDTAVYHCAAAFQALGSPREYDY WGQGTQVTVSS

En particular, la divulgación en algunos aspectos específicos proporciona:

- 5 - secuencias de inmunoglobulina que se dirigen contra (tal como se define en el presente documento) un canal iónico y que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, tal como el 90% o el 95% o más identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780 (véase la tabla A-1). Estas secuencias de inmunoglobulina pueden además ser tales que neutralizan la unión del ligando relacionado con un canal iónico; y/o compiten con el
- 10 ligando relacionado por la unión a un canal iónico; y/o se dirigen contra un sitio de interacción (tal como se define en el presente documento) en un canal iónico (tal como el sitio de unión a ligando);
- secuencias de inmunoglobulina que bloquean de manera cruzada (tal como se define en el presente documento) la unión de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ
- 15 ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780 (véase la tabla A-1) a un canal iónico y/o que compiten con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780 (véase la tabla A-1) por la unión a un canal iónico. De nuevo, estas secuencias
- 20 de inmunoglobulina pueden además ser tales que neutralizan la unión del ligando relacionado con un canal iónico; y/o compiten con el ligando relacionado por la unión a un canal iónico; y/o se dirigen contra un sitio de interacción (tal como se define en el presente documento) en un canal iónico (tal como el sitio de unión a ligando);
- secuencias de inmunoglobulina que pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento (y
- 25 pueden ser, por ejemplo, Nanobodies); así como polipéptidos de la divulgación que comprenden una o más de tales secuencias de inmunoglobulina (que pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento, y pueden ser, por ejemplo, polipéptidos biespecíficos y/o biparatópicos tal como se describe en el presente documento), y secuencias de ácido nucleico que codifican para tales secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos. Tales secuencias de inmunoglobulina y polipéptidos no incluyen ningún ligando que se produce de manera natural.
- 30 Por consiguiente, algunos Nanobodies particularmente preferidos de la divulgación son Nanobodies que pueden unirse (tal como se define además en el presente documento) a y/o se dirigen contra un canal iónico y que:
- i) tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina
- 35 de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780 (véase la tabla A-1), en la que para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan. En este respecto, también se hace referencia a la
- 40 tabla B-1, que enumera las secuencias de región de entramado 1 (SEQ ID NO: 126 a 207), las secuencias de región de entramado 2 (SEQ ID NO: 290 a 371), secuencias de región de entramado 3 (SEQ ID NO: 454 a 535) y secuencias de región de entramado 4 (SEQ ID NO: 618 a 699) de los Nanobodies de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780 (véase la tabla A-1) (con respecto a los
- 45 residuos de aminoácido en las posiciones 1 a 4 y 27 a 30 de las secuencias de región de entramado 1, también se hace referencia a los comentarios realizados a continuación. Por tanto, para determinar el grado de identidad de aminoácidos, estos residuos se descartan preferiblemente);
- y en los que:
- 50 ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2 a continuación.

En estos Nanobodies, las secuencias de CDR son generalmente tal como se define además en el presente documento.

De nuevo, tales Nanobodies pueden ser secuencias de V_{HH} que se producen de manera natural (es decir, a partir de una especie adecuada de camélido) o secuencias de inmunoglobulina sintéticas o semisintéticas, incluyendo pero sin limitarse a Nanobodies "humanizados" (tal como se define en el presente documento), secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (tal como se define en el presente documento) (y en particular secuencias de dominio variable de cadena pesada camelizadas), así como Nanobodies que se han obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad (por ejemplo, a partir de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o que se producen de manera natural), injerto de CDR, remodelación de superficie, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje de PCR usando cebadores solapantes, y técnicas similares para la modificación por ingeniería genética de secuencias de inmunoglobulina bien conocidas para el experto; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de lo anterior tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Además, cuando un Nanobody comprende una secuencia de V_{HH} , dicho Nanobody puede humanizarse de manera adecuada, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, para proporcionar uno o más Nanobodies adicionales (parcial o totalmente) humanizados de la divulgación. De manera similar, cuando un Nanobody comprende una secuencia sintética o semisintética (tal como una secuencia parcialmente humanizada), dicho Nanobody puede opcionalmente humanizarse adicionalmente de manera adecuada, de nuevo tal como se describe en el presente documento, de nuevo para proporcionar uno o más Nanobodies adicionales (parcial o totalmente) humanizados de la divulgación.

En particular, los Nanobodies humanizados pueden ser secuencias de inmunoglobulina que son generalmente tal como se define para Nanobodies en los párrafos anteriores, pero en los que al menos un residuo de aminoácido está presente (y en particular, en al menos uno de los residuos de región de entramado) que es y/o que se corresponde con una sustitución humanizante (tal como se define en el presente documento). Algunas sustituciones humanizantes preferidas, pero no limitativas (y combinaciones adecuadas de las mismas) resultarán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Además, o alternativamente, pueden determinarse otras sustituciones humanizantes potencialmente útiles comparando la secuencia de las regiones de entramado de una secuencia de V_{HH} que se produce de manera natural con la correspondiente secuencia de región de entramado de una o más secuencias de V_H humanas estrechamente relacionadas, tras lo cual una o más de las posibles sustituciones humanizantes útiles (o combinaciones de las mismas) así determinadas, pueden introducirse en dicha secuencia de V_{HH} (de cualquier manera conocida *per se*, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) y las secuencias de V_{HH} humanizadas resultantes pueden someterse a prueba para determinar la afinidad para la diana, para la estabilidad, para la facilidad y nivel de expresión, y/o para otras propiedades deseadas. De esta manera, por medio de un grado limitado de ensayo y error, pueden determinarse otras sustituciones humanizantes adecuadas (o combinaciones adecuadas de las mismas) por el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Además, basándose en lo anterior, (las regiones de entramado de) un Nanobody pueden humanizarse parcialmente o pueden humanizarse totalmente.

En un aspecto preferido pero no limitativo, la divulgación se refiere a un Nanobody (tal como se define en el presente documento) contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen una diferencia de 3, 2 ó 1 aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289; y/o

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen una diferencia de 3, 2 ó 1 aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453; y/o

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen una diferencia de 3, 2 ó 1 aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617; o cualquier fragmento adecuado de una secuencia de inmunoglobulina de este tipo.

En particular, según este aspecto preferido pero no limitativo, la divulgación se refiere a un Nanobody (tal como se define en el presente documento) contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen una diferencia de 3, 2 ó 1 aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289; y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen una diferencia de 3, 2 ó 1 aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

y

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen una diferencia de 3, 2 ó 1 aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

o cualquier fragmento adecuado de una secuencia de inmunoglobulina de este tipo.

Tal como se menciona generalmente en el presente documento para las secuencias de inmunoglobulina de la divulgación, cuando un Nanobody de la invención contiene una o más secuencias de CDR1 según b) y/o c):

i) cualquier sustitución de aminoácido en una CDR de este tipo según b) y/o c) es preferiblemente, y en comparación con la correspondiente CDR según a), una sustitución de aminoácido conservadora (tal como se define en el presente documento);

y/o

ii) la CDR según b) y/o c) preferiblemente sólo contiene sustituciones de aminoácido, y sin deleciones o inserciones de aminoácido, en comparación con la correspondiente CDR según a);

y/o

iii) la CDR según b) y/o c) puede ser una CDR que deriva de una CDR según a) por medio de maduración de afinidad usando una o más técnicas de maduración de afinidad conocidas *per se*.

De manera similar, cuando un Nanobody de divulgación contiene una o más secuencias de CDR2 según e) y/o f):

i) cualquier sustitución de aminoácido en una CDR de este tipo según e) y/o f) es preferiblemente, y en comparación con la correspondiente CDR según d), una sustitución de aminoácido conservadora (tal como se define en el presente documento);

y/o

ii) la CDR según e) y/o f) preferiblemente sólo contiene sustituciones de aminoácido, y sin deleciones o inserciones de aminoácido, en comparación con la correspondiente CDR según d);

y/o

iii) la CDR según e) y/o f) puede ser una CDR que deriva de una CDR según d) por medio de maduración de afinidad usando una o más técnicas de maduración de afinidad conocidas *per se*.

Además, de manera similar, cuando un Nanobody de la invención contiene una o más secuencias de CDR3 según h) y/o i):

i) cualquier sustitución de aminoácido en una CDR de este tipo según h) y/o i) es preferiblemente, y en comparación con la correspondiente CDR según g), una sustitución de aminoácido conservadora (tal como se define en el presente documento);

y/o

ii) la CDR según h) y/o i) preferiblemente sólo contiene sustituciones de aminoácido, y sin deleciones o inserciones de aminoácido, en comparación con la correspondiente CDR según g);

y/o

iii) la CDR según h) y/o i) puede ser una CDR que deriva de una CDR según g) por medio de maduración de afinidad usando una o más técnicas de maduración de afinidad conocidas *per se*.

Debe entenderse que los últimos tres párrafos se aplican generalmente a cualquier Nanobody de la divulgación que comprende una o más secuencias de CDR1, secuencias de CDR2 y/o secuencias de CDR3 según b), c), e), f), h) o i), respectivamente.

De los Nanobodies de la divulgación, se prefieren particularmente Nanobodies que comprenden una o más de las CDR indicadas explícitamente antes; se prefieren más particularmente Nanobodies que comprenden dos o más de las CDR indicadas explícitamente antes; y se prefieren lo más particularmente Nanobodies que comprenden tres de las CDR indicadas explícitamente antes.

Algunas combinaciones particularmente preferidas pero no limitativas de secuencias de CDR, así como combinaciones preferidas de secuencias de CDR y secuencias de región de entramado, se mencionan en la tabla B-1 a continuación, que indica las secuencias de CDR y secuencias de región de entramado que están presentes en varios Nanobodies preferidos (pero no limitativos) de la divulgación. Tal como será evidente para el experto, una combinación de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que se producen en el mismo clon (es decir secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que se mencionan en la misma línea en la tabla B-1) se preferirán habitualmente (aunque la divulgación en su sentido más amplio no se limita a las mismas, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias de CDR mencionadas en la tabla B-1). Además, una combinación de secuencias de CDR y secuencias de región de entramado que se producen en el mismo clon (es decir secuencias de CDR y secuencias de región de entramado que se mencionan en la misma línea en la tabla B-1) se preferirán habitualmente (aunque la invención en su sentido más amplio no se limita a las mismas, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias de CDR y secuencias de región de entramado adecuadas mencionadas en la tabla B-1, así como combinaciones de tales secuencias de CDR y otras secuencias de región de entramado adecuadas, por ejemplo tal como se describe adicionalmente en el presente documento).

Además, en los Nanobodies de la divulgación que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas en la tabla B-1, cada CDR puede reemplazarse por una CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con las CDR mencionadas; en las que:

i) cualquier sustitución de aminoácido en una CDR de este tipo es preferiblemente, y en comparación con la correspondiente secuencia de CDR mencionada en la tabla B-1, una sustitución de aminoácido conservadora (tal como se define en el presente documento);

y/o

- 5 ii) cualquier secuencia de CDR de este tipo preferiblemente sólo contiene sustituciones de aminoácido, y sin delecciones o inserciones de aminoácido, en comparación con la correspondiente secuencia de CDR mencionada en la tabla B-1;

y/o

- 10 iii) cualquier secuencia de CDR de este tipo es una CDR que deriva por medio de una técnica para la maduración de afinidad conocida *per se*, y en particular a partir de la correspondiente secuencia de CDR mencionada en la tabla B-1.

- 15 Sin embargo, tal como será evidente para el experto, las (combinaciones de) secuencias de CDR, así como (las combinaciones de) secuencias de CDR y secuencias de región de entramado mencionadas en la tabla B-1 se preferirán generalmente.

- 20 Tabla B-1: combinaciones preferidas de secuencias de CDR, combinaciones preferidas de secuencias de región de entramado, y combinaciones preferidas de secuencias de región de entramado y de CDR

("ID" se refiere al SEQ ID NO tal como se usa en el presente documento)

ID FR1	ID CDR1	ID FR2	ID CDR2	ID FR3	ID CDR3	ID FR4
EVQLVESG GDVVQAGG				RFTISSDKEKNTLYLQ		
12 6 SLRLSCLAS GFTFD	20 8 DYAI G	29 0 WFRQAPGKE REGIS	37 2 CISSTGNVIFYADSVKG	45 4 MNSLKPEDTAVYHCA A	53 6 GHFTVDSGKV LLRTDISS	61 8 WGQGT QVTVSS
EVQLVESG GDVVQAGG				RFTISSDKEKNTLYLQ		
12 7 SLRLSCLAS GFTFD	20 9 DYAI G	29 1 WFRQAPGKE REGIS	37 3 CISSTGNVIFYADSVKG	45 5 MNSLEPEDTAVYHCA A	53 7 GHFTVDSGKV LLRTDISS	61 9 WGQGT QVTVSS
EMQLVESG GDVVQAGG				RFTISSDKEKNTLYLQ		
12 8 SLRLSCLAS GFTFD	21 0 DYAI G	29 2 WFRQAPGKE REGIS	37 4 CISSTGNVIFYADSVKG	45 6 MNSLKPEDTAVYHCA A	53 8 GHFTVDSGKV LLRTDISS	62 0 WGQGT QVTVSS
EVQLVESG GDVVQAGG				RFTISSDKEKNTLYLQ		
12 9 SLRLSCLAS GFTFD	21 1 DYAI G	29 3 WFRQAPGKE REGIS	37 5 CISSTGNVIFYADSVKG	45 7 MNSLKPGDTAVYHC AA	53 9 GHFTVDSGKV LLRTDISS	62 1 WGQGT QVTVSS
EVQLVESG GDVVQAGG				RLTSSDKEKNTLYLQ		
13 0 SLRLSCLAS GFTFD	21 2 DYAI G	29 4 WFRQAPGKE REGIS	37 6 CISSTGNVIFYADSVKG	45 8 MNSLKPEDTAVYHCA A	54 0 GHFTVDSGKV LLRTDISS	62 2 WGQGT QVTVSS

13 1	EVQLVESG GDWQAGG SLRLSCLAS GFTFD	21 3	DYAI G	29 5	WFRQAPGKE REGIS	37 7	CISSTGNVIFYADSVKG	45 9	RFTISSDKEKNTLYLQ MDSLKPEDTAVYHCA A	54 1	GHFTVDSGKV LLRTDISS	62 3	WGQGT QVTVSS
13 2	EVQLVESG GDWQAGG SLRLSCLAS GFTFD	21 4	DYAI G	29 6	WFRQAPGKE REGIS	37 8	CISSTGNVIFYADSVKG	46 0	RFTISSDKEKNTLYLQ MNSLKPEDTAVYHCA A	54 2	GHFTVDSGKV LLRTDVSS	62 4	WGQGT QVTVSS
13 3	EVQLVESG GGLVQTGG SLRLSCAAS GFTLD	21 5	DYAI A	29 7	WFRQAPGKE REGVS	37 9	ILSSIGKTFYADSVKD	46 1	RFSITADGAKTTVFLQ MNSLKPEDTAVYCV A	54 3	GHFVYNDGAI SLNTARGSGF	62 5	WGQGA QVTVSS
13 4	EVQLVESG GGLVQTGG SLRLSCAAS GFTLD	21 6	DYAI A	29 8	WFRQAPGKE REGVS	38 0	ILSSIGKTFYADSVKD	46 2	RFSITADGAKTTVFLQ MNSLKPEDTAVYCV A	54 4	GHFVYNDGAI SLNTARGSGF	62 6	WGQGA QVTVSS
13 5	EVQLVESG GGLVQTGG SLRLSCAAS GFTLD	21 7	DYAI A	29 9	WFRQAPGKE REGVS	38 1	ILSSIGKTFYADSVKD	46 3	RFSITADGAKTTVFLQ MNSLKPEDTAVYCV A	54 5	GHFVYNDGAI SLNTARGSGF	62 7	WGQGT QVTVSS
13 6	EVQLVESG GGLVQTGG SLRLSCAAS GFTLD	21 8	DYAI A	30 0	WFRQAPGKE REGVS	38 2	ILSSIGKTFYADSAKD	46 4	RFSITADGAKTTVFLQ MNSLKPEDTAVYCV A	54 6	GHFVYNDGAI SLNTARGSGF	62 8	WGQGT QVTVSS

13 7	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS ERTYS	21 9	MG	30 1	WFRQAPGKE REFVA	38 3	GSGWDGIPTRYADSVK G	46 5	RLTISRDNAKNTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	54 7	GTSVWHYQY	62 9	WGQGT QVTVSS
13 8	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS ERTYS	22 0	MG	30 2	WFRRAPGKE REFVA	38 4	GSGWDGIPTRYADSVK G	46 6	RFTISRDNAKNTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	54 8	GTSVWHYQY	63 0	WGQGT QVTVSS
13 9	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS ERTYS	22 1	VG	30 3	WFRQAPGKE REFVA	38 5	GSGWDGIPTRYADSVK G	46 7	RFTISRDNAKNTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	54 9	GTSVWHYQY	63 1	WGQGT QVTVSS
14 0	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAP ERTYS	22 2	MG	30 4	WFRQAPGKE REFVA	38 6	GSGWDGIPTRYADSVK G	46 8	RFTISRDNAKNTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	55 0	GTSVWHYQY	63 2	WGQGT QVTVSS
14 1	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS ERTYS	22 3	MG	30 5	WFRQAPGKE REFVA	38 7	GSGWDGIPTRYADSVK G	46 9	RFTISRDNAKNTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	55 1	GTSVWHYQY	63 3	WGQGT QVTVSS
14 2	EVQLVESR GGLVQAGG SLRLSCAAS ERTYS	22 4	MG	30 6	WFRQAPGKE REFVA	38 8	GSGWDGIPTRYADSVK S	47 0	RFTISRDNAKNTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	55 2	GTSVWHYQY	63 4	WGQGT QVTVSS

14 3	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS ERTYS	22 5	MG	30 7	WFRQAPGKE REFVA	38 9	GSGWDGIPTRYADSVK G	47 1	RFTISRDNNAKNAVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	55 3	GTSVYHYQY	63 5	WGQGT QVTVSS
14 4	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS ERTYS	22 6	MG	30 8	WFRQAPGKE REFVA	39 0	GSGWDGIPTRYADSVK G	47 2	RFTISRDNNAKNTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	55 4	GTSVYHYQY	63 6	WGQGT QVTVSS
14 5	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS ERTYS	22 7	MG	30 9	WFRQAPGKE REFVA	39 1	GSGWDGIPTRYADSVK G	47 3	RFTISRDNNAKSTVSL QMSGGLKPEDIAIYYC AT	55 5	GTSVYHYQY	63 7	WGQGT QVTVSS
14 6	KVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTVS	22 8	DYG- MG	31 0	WFRQAPGKL REFVA	39 2	SINWSGIYTRYIDSVEG	47 4	RFTISRDNNTKNTLYLQ MNNLRAEDTAVYYC AY	55 6	FLGPNWYSN YGRPSSYDF	63 8	YGQGTQ VTVSS
14 7	EVQLMESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTVS	22 9	DYG- MG	31 1	WFRQAPGKL REFVA	39 3	SINWSGIYTRYIDSVEG	47 5	RFTISRDNNTKNTLYLQ MNNLKAEDTAVYYCA Y	55 7	FLGPNWYSN YGRPSSYDF	63 9	YGQGTQ VTVSS
14 8	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTVS	23 0	DYG- MG	31 2	WFRQAPGKL REFVA	39 4	SINWSGIYTRYIDSVEG	47 6	RFTISRDNNTKNTLYLQ MNNLKAEDTAVYYCA Y	55 8	FLGPNWYSN YGRPSSYGF	64 0	YGQGTQ VTVSS

14	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTVS	23 1	DYG- MG	31 3	WFRQAPGKE CEFVA	39 5	SINWSGTYTRYIDSVEG	47 7	RFTISRDNNTENTLYLQ MNNLKAEDTAVYYCA Y	55 9	FLGPNWYSD YGRPSSYDF	64 1	YQGQTQ VTVSS
15	EVQLMESG GGLVQAGG PLRLSCAAS GRTVS	23 2	DYG- MG	31 4	WFRQAPGKE REFVA	39 6	SINWSGTYTRYIDSVEG	47 8	RFTISRDNNTENTLYLQ MNNLKAEDTAVYYCA Y	56 0	FLGPNWYSD YGRPSSYDF	64 2	YQGQTQ VTVSS
15	AVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GNFFR	23 3	VNT- MA	31 5	WYRQAPGKQ RELVA	39 7	DITRGDRNTYADTVNG	47 9	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLRPEDTAAYY CYA	56 1	VIELGVLEPRD Y	64 3	WGQGT QVTVSS
15	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GNFFR	23 4	VNT- MA	31 6	WYRQAPGKQ RELVA	39 8	DITRGDRNTYADTVNG	48 0	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAAYY CYA	56 2	RIELGVLEPR DY	64 4	WGQGT QVTVSS
15	EVQLVESG GGLVQAGG PLRLSCAAS GNFFR	23 5	VNT- MA	31 7	WYRQAPGKQ RELVA	39 9	DITRGDRNTYADTVNG	48 1	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAAYY CYA	56 3	RIELGVLEPR DY	64 5	WGQGT QVTVSS
15	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	23 6	VN- NMA	31 8	WYRQAPGKQ RELVA	40 0	DITRGDRNTYADSVNG	48 2	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAAYY CYA	56 4	RIELGVLEPR DY	64 6	WGQGT QVTVSS

15 5	EVQLVESG GGLVQAGG PLRLSCAAS GSFFR	23 7	VN- NMA	31 9	WYRQAPGKQ RELVA	40 1	DITRGDRNTYADSVNG	48 3	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAAYY CYA	56 5	RIELGVLEPR DY	64 7	WGQGT QVTVSS
15 6	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GNFFR	23 8	VNT- MA	32 0	WYRQAPGKQ RELVA	40 2	DITRGDRNTYADTVNG	48 4	RFTISRDNVRNTVYL QMNSLKPEDTAAYY CYA	56 6	RIELGVLEPR DY	64 8	WGQGT QVTVSS
15 7	EVQLVESG GGLVQAGG SLGLSCAAS GNFFR	23 9	VNT- MA	32 1	WYRQAPGKQ RELVA	40 3	DITRGDRNTYADTVNG	48 5	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAAYY CYA	56 7	RIELGVLEPR DY	64 9	WGQGT QVTVSS
15 8	EMQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GNFFR	24 0	VNT- MA	32 2	WYRQAPGKQ RELVA	40 4	DITRGDRNTYADTVNG	48 6	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAAYY CYA	56 8	RIELGVLEPR DY	65 0	WGQGT QVTVSS
15 9	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLCAAS GSFFR	24 1	VN- NMA	32 3	WYRQAPGKQ RELVA	40 5	DITRGDRNTYADSVNG	48 7	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAAYS CYA	56 9	RIELGILEPRD Y	65 1	WGQGT QVTVSS
16 0	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	24 2	VN- NMA	32 4	WYRQAPGKQ RELVA	40 6	DITRGDRNTYADSVNG	48 8	RFTISRDNVRNTVYL QMDGLKPEDTAAYY CYA	57 0	RIELGVLPVR DY	65 2	WGQGT QVTVSS

16 1	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	24 3	VN- NMA	32 5	WYRQAPGKQ RELVA	40 7			48 9	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 1	RIELGPLVPR DY	65 3	WGQGT QVTVSS
16 2	EVQLVKSG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	24 4	VN- NMA	32 6	WYRQAPGKQ RELVA	40 8			49 0	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 2	RIELGPLVPR DY	65 4	WGQGT QVTVSS
16 3	KVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	24 5	VN- NMA	32 7	WYRQGPQKQ RELVA	40 9			49 1	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 3	TIELGVLEPRD Y	65 5	WGQGT QVTVSS
16 4	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	24 6	VNV- MA	32 8	WYRQGPQKQ RELVA	41 0			49 2	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 4	TIELGVLEPRD Y	65 6	WGQGT QVTVSS
16 5	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAAS GSFFR	24 7	VN- NMA	32 9	WYRQGPQKQ RELVA	41 1			49 3	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 5	TIELGVLEPRD Y	65 7	WGQGT QVTVSS
16 6	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	24 8	VN- NMA	33 0	WYRQAPGKQ RELVA	41 2			49 4	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 6	TIELGVLEPRD Y	65 8	WGQGT QVTVSS

16 7	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	24 9	VN- NMA	33 1	WYRQPGKQ RELVA	41 3	DITRGDRNTYADSVNG	49 5	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 7	TIELGVLEPRD Y	65 9	WGQGT QVTVSS
16 8	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS GSFFR	25 0	VN- NMA	33 2	WYRQAPGKQ RELVA	41 4	DITRGDRNTYADSVNG	49 6	RFTISRDNVRNTVYL QMNGLKPEDTAVYY CYA	57 8	TIELGVLEPRD Y	66 0	WGQGT QVTVSS
16 9	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GSFFR	25 1	VN- NMA	33 3	WYRQPGKQ RELVA	41 5	DITRGDRNTYADSVNG	49 7	RFTISRDNVRNTVYL QMDGLKPEDTAVYY CYA	57 9	TIELGVLEPRD Y	66 1	WGQGT QVTVSS
17 0	EVQLVESG GDLVQAGG SLKLSGVVS GVTFD	25 2	DGTI G	33 4	WFRQAPGKE REGIA	41 6	CISRVDGTTYYRDSVKG	49 8	RFTVSSDSAKTTVNL QMNSLKPEDTAVYY CAA	58 0	DYASLCTIETG YGSLYDY	66 2	WGRGT QVTVSS
17 1	EVQLVESG GDLVQAGG SLKLSGVVS GVTFD	25 3	DGTI G	33 5	WFRQAPGKE REGIA	41 7	CISRVDGTTYYRDSVKG	49 9	RFTVSSDSAKTTVNL QMNSLKPEDTAVYY CAA	58 1	DYASLCTIETG YGSLYDY	66 3	WGKGT QVTVSS
17 2	EMQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRIFS	25 4	SLAM G	33 6	WLRQAPGKE REFVS	41 8	GISRGGTSTYYADSVKG	50 0	RFTISRDNNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYY CAG	58 2	SPVLSIMLDTR GLE Y	66 4	WGQGT QVTVSS

17 3	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTFS	25 5	SLAM G	33 7	WLRQAPGKE REFVS	41 9	GISRGGTSTYYADSVKG	50 1	RFTISRDNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYY CAG	58 3	SPVLSIVLDTR GLE Y	66 5	WGQGT QVTVSS
17 4	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTFS	25 6	SLAM G	33 8	WLRQAPGKE REFVS	42 0	GISRGGTSTYYADSVKG	50 2	RLTISRDNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYY CAG	58 4	SPVLSIVLDTR GLE Y	66 6	WGQGT QVTVSS
17 5	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTFG	25 7	SSPV G	33 9	WFRQAPGKE RDFVA	42 1	TISWNGVDTHYLD SVKG	50 3	RFTISRDNAKNTVHL QMHILKPEDTALYYC AA	58 5	STSGSVYLPY RVYQYDS	66 7	WGQGT QVTVSS
17 6	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTFS	25 8	SSPV G	34 0	WFRQAPGKE RDFVA	42 2	TISWNGVDTHYLD SVKG	50 4	RFTISRDNALNTVHL QMHILKPEDTALYYC AA	58 6	STSGSAYLPY RVYQYDS	66 8	WGQGT QVTVSS
17 7	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRTFS	25 9	SSPV G	34 1	WFRQAPGKE RDFVA	42 3	TISWNGVDTHYLD SVKG	50 5	RFTISRDNALNTVHL QMHILKPEDTALYYC AA	58 7	STSGSAYLPY RVHQYDS	66 9	WGQGT QVTVSS
17 8	EVQLVESG GGLVQAGA SLRVSCAAS ARTGS	26 0	YTM G	34 2	WFRQAPGKE REFVS	42 4	TISWNGASTVYYADSVKG	50 6	RFTISRDNAKNTVSL QMNSLKPEDTAVYY CAG	58 8	SISSYSSRWQ DDY EY	67 0	WGQGT QVTVSS

17 9	EVQLVESG GGLVQAGG SLRVSCAAS ARTGS	26 1	YSM G	34 3	WFRQAPGKE REFVS	42 5	TISWNGADTVYADSVKG	50 7	RFTISRDNNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CAG	58 9	SITSYVSTWQ HDYEY	67 1	WGQGT QVTVSS
18 0	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GRNFG	26 2	SYT- MA	34 4	WFRQAPGKG REFVS	42 6	TINWSGGDTDYADSVK G	50 8	RFTISRDNNAKNTVYL QMDSLKPEDTAVYY CAA	59 0	GLEYMSTIRY TYEY	67 2	WGQGT QVTVSS
18 1	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCVVS GSMYR	26 3	IDN- MG	34 5	WYRQAPGKQ RELVA	42 7	TVTRGDITNYADSVKG	50 9	RFTIGRDNNAKNTVYL QMNSLKPADTAVYY CNI	59 1	DSYIIGAGVRD Y	67 3	WGRGT QVTVSS
18 2	EVQLVESG GGLVQSGG SLRLSCAGS GFSYY	26 4	IIG	34 6	WFRQAPGKE REEVS	42 8	CIRVTDGSTYYTNSVKG	51 0	RFTMSRDNAENTVYL QMNSLKPEDTAVYS CAT	59 2	ECQRWAYPN RIGA	67 4	RGQGT QVTVSS
18 3	EVQLVESG GGLVQSGG SLRLSCAGS GFSYY	26 5	IIG	34 7	WFRQAPGKE REEVS	42 9	CIRVTDGSTYHTNSVKG	51 1	RFTMSRDNAENTVYL QMNSLKPEDTAVYS CAT	59 3	ECQRWAYPN RIGA	67 5	RGQGT QVTVSS
18 4	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS GLTLE	26 6	YNI G	34 8	WFRQAPGKE REGVA	43 0	CIDWTEGSTFYVDSVKG	51 2	RFTISTDNNAKNTVYLH MNSLEPEDTAVYYCA A	59 4	GWGRVITVQH MCADRSLFTS	67 6	WGQGT QVTVSS

18 5	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS GLTLT	26 7	YYNI G	34 9	WFRQAPGKE REGVS	43 1	CIDWTDGTTFYADSVKG	51 3	RFTISTDNAKNTVYLH LNSLEPEDTAVYYCA A	59 5	GWGRVMTVQ HMCADRSFLT S	67 7	WGQGT QVTVSS
18 6	EVQLVESG GGLVQAGD SLRLSCAAS GRTFS	26 8	SVAV G	35 0	WFRQAPGKE RDFVA	43 2	WISWSDISTYYADSVK G	51 4	RFTASRDNVNNTVYL QMNSLKPEDTADYY CAA	59 6	AWKYDRASY DFPEAYDY	67 8	WGQGT QVTVSS
18 7	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS PGTFS	26 9	SFN- MG	35 1	WFRQTPGKE REFVA	43 3	ATSWSDISTYYADSVKG	51 5	RFTISRDNKNTVTLE MNSLKPEDTAVYYCA A	59 7	GYRGGYLG YRLTLEGSYD V	67 9	WGQGT QVTVSS
18 8	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS PGAFS	27 0	SFN- MG	35 2	WFRQTPGKE REFVA	43 4	ATSWSDISTYYADSVKG	51 6	RFTISRDNKNTVTLE MNSLKPEDTAVYYCA A	59 8	GYRGGYLG YRLTLEGSYD V	68 0	WGQGT QVTVSS
18 9	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS PGTFS	27 1	SFN- MG	35 3	WFRQTPGKE REFVA	43 5	ATSWSDISTYYADSVKG	51 7	RFTISRDNKNTVTLE MNSLKPEDTAVYYCA A	59 9	GYRGGYLG YRLTLEGSYD V	68 1	WGQGT QVTVSS
19 0	EVQLVKSG GGLVQAGG SLRLSCAAS PGTFS	27 2	SFN- MG	35 4	WFRQTPGKE REFVA	43 6	ATSWSDISTYYADSVKG	51 8	RFTISRDNKNTVTLE MNSLKPEDTAVYYCA A	60 0	GYRGGYLG YRLTLEGSYD V	68 2	WGQGT QVTVSS

19 1	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCVVS GRTFS	27 3	AMG 5	35	WFRQAPGKE REFVA	43 7	TVGWNPIMNSYYGDSVK G	51 9	RFTIFRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CAG	60 1	SGSLLDVTSE AVYTD	68 3	WGQGT QVTVSS
19 2	KVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GPSIS	27 4	SYA MG	35 6	WYRQAPGKP RELVA	43 8	RIYGGTAWYEDSVKG	52 0	RFTISRDNAQNTVYL QMNSLKSEDTAVYY CHG	60 2	RVRYDY	68 4	WGQGT QVTVSS
19 3	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS DRTFG	27 5	SSA- MG	35 7	WFRQAPGKD RDFVA	43 9	AISWGSSTHYADSVKG	52 1	RFTISRDNAKNTMYL QMNSLKPADTAVYTC AA	60 3	SRRAYLPAKV GEYDF	68 5	WGQGT QVTVSS
19 4	EVQLVESG GGLVQAGD SLRLSCAAS GRTFS	27 6	SYA MG	35 8	WFRQAPGKE REFVA	44 0	AISLGSMTYYADSMKG	52 2	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CAA	60 4	EELGDGLGYL AYRYDY	68 6	WGQGT QVTVSS
19 5	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS GFTFS	27 7	TNIM T	35 9	WVRQAPGKG LEWIS	44 1	TINSGGGTTTYADSVRG	52 3	RFTISRDNAKNMLYL QMSSSLKPEDTALYYC IT	60 5	PRGV	68 7	KGRGTQ VTVSS
19 6	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS DRTFG	27 8	SST- MG	36 0	WFRQPPGKN REFVA	44 2	TIAWSATTTTHYADAVKG	52 4	RFTVSRDNALNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CAA	60 6	TLTWLGIHEY EYNT	68 8	WGQGT QVTVSS

19 7	EVQLVESG GGLVQPGE SLRLSCTAS RFMLD	27 9	YY- DIG	36 1	WFRQAPGKE REGVS	44 3	CRFTNDGSTAYADSVK G	52 5	RFTISRDNKHTVYLQ MNSLQPEDTAVYYC AA	60 7	GPLTKRRQCV PGDFSMDF	68 9	WGEGL VTVSS
19 8	EVQLVESG GGLVQPGE SLRLSCTAS RFDLD	28 0	YY- DIA	36 2	WFRQAPGKE REGVS	44 4	CSFTNDGSTYYADSVK G	52 6	RFTMSRNDHRTVY LQMTSLQPEDTAVYT CAV	60 8	GPLTRRRQCV PGDFSMDF	69 0	WGEGL VTVSS
19 9	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCVAS GRTFS	28 1	ILT- MG	36 3	WFRQAPGKE REFVA	44 5	AISGIGAIHYADSVKG	52 7	RFTLSRDNARNTVSL HMNSLKPEDTAVYYC AA	60 9	KANYESPSRE TSYAY	69 1	WQQGT QVTVSS
20 0	EVQLVESG GRVMQTGG SLRLSCAAS GHTFN	28 2	DYS- MG	36 4	WFRQAPGKE LEFLA	44 6	GINWSGMSTWYADSVK D	52 8	RFTISRDNKNTVFL QMNSLEPGDTAVYY CAA	61 0	RQWISTIILTA PSQYDY	69 2	WQQGT QVTVSS
20 1	EVQLVESG GRVMQTGG SLRLSCAAS GHTFN	28 3	DYN- MG	36 5	WFRQAPGKE LEFLA	44 7	GINWSGMSTWYADSVK D	52 9	RFTISRDNKNTVFL QMNSLEPGDTAVYY CAA	61 1	RQWISTIILTA PSQYDY	69 3	WQQGT QVTVSS
20 2	EVQLVESG GDLVQPGE SLRLSCVAS GFALE	28 4	EHAI G	36 6	WFRQAPGKE REGVS	44 8	LSSYLGAAYYATSVKG	53 0	RFTISRDNKNTVTL QMNSLKPEDTAVYY CAR	61 2	GHFTYDDGRI TIRSDY	69 4	WGKGT VTVSS

20 3	EVQLVESG GDLVQPGG SLRLSCVAS GFALE	28 5	EHAI 7		WFRQAPGKE REGVS	44 9		LSSVVGAVYYATSVKG	53 1	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CAR	61 3	GHFTYDDGRI SIRSDH	69 5	WGKGT L VTSS
20 4	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCVAS GRTLS	28 6	TAVM 8		WFRQAPGKE RGLVA	45 0		MISWSGSMYYAKSVK G	53 2	RFTISRDNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYY CAA	61 4	DMGGGPPDG DAMPRLSSG MDY	69 6	WGKGT L VTSS
20 5	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GNDFA	28 7	DAM 9	RFSI-	WYRQAPGKQ RELVA	45 1		TVTEDGTKNYADSVKG	53 3	RATISRDDANNMYL EMNTLKPEDTAVYYC KM	61 5	GGLIDGAAPY EF	69 7	WGRGT L QVTSS
20 6	EMQLVESG GGWVQAG GSLRLSCAS SGSIFS	28 8	AG- 0		WYRQAPGKQ RELVA	45 2		DITLGGSTNYADSVKG	53 4	RFTISRDNAKNAVFL QMNSLKPEDTAVYY CNG	61 6	LINTFARKIPR YA	69 8	WQQT L QVTSS
20 7	EVQLVESG GGLVQAGG SLRLSCAAS GPTTF	28 9	GRYT 1		WFRQAPGRE REFVA	45 3		AISWIGGRYYVDWKG	53 5	RFTISRDNAKKMYL QMNSLKPDDTAVYH CAA	61 7	AFQALGSPRE YDY	69 9	WQQT L QVTSS

Por tanto, en los Nanobodies de la invención, al menos una de la secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1; o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de "identidad de secuencia" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o sólo 1 "diferencia de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1.

En este contexto, por "elegido de manera adecuada" quiere decirse que, según sea aplicable, una secuencia de CDR1 se elige de secuencias de CDR1 adecuadas (es decir tal como se define en el presente documento), una secuencia de CDR2 se elige de secuencias de CDR2 adecuadas (es decir tal como se define en el presente documento), y una secuencia de CDR3 se elige de secuencia de CDR3 adecuada (es decir tal como se define en el presente documento), respectivamente. Más en particular, las secuencias de CDR se eligen preferiblemente de modo que los Nanobodies de la invención se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afinidad (medida y/o expresada adecuadamente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off} , o alternativamente como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento.

En particular, en los Nanobodies de la invención, al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla B-1 o del grupo de secuencias de CDR3 que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla B-1.

Preferiblemente, en los Nanobodies de la invención, al menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1 o del grupo que consiste en secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o sólo 1 "diferencia de aminoácido" con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1.

En particular, en los Nanobodies de la invención, al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla B-1 o del grupo de secuencias de CDR3 que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla B-1, respectivamente; y al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1 o del grupo de secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1.

Lo más preferiblemente, en los Nanobodies de la invención, las tres secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1 o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1.

Incluso más preferiblemente, en los Nanobodies de la invención, al menos una de la secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1. Preferiblemente, en este aspecto, al menos una o preferiblemente ambas de las otras dos secuencias de CDR presentes se eligen adecuadamente de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las correspondientes secuencias de CDR, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR que

tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las correspondientes secuencias, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1.

En particular, en los Nanobodies de la invención, al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en la CDR3 enumerada en la tabla B-1. Preferiblemente, en este aspecto, al menos una y preferiblemente ambas de las secuencias de CDR1 y CDR2 presentes se eligen adecuadamente de los grupos de secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1.

Incluso más preferiblemente, en los Nanobodies de la invención, al menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1. Preferiblemente, en este aspecto, la secuencia de CDR restante presente se elige de manera adecuada del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las correspondientes secuencias de CDR enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las correspondientes secuencias enumeradas en la tabla B-1.

En particular, en los Nanobodies de la invención, al menos la secuencia de CDR3 se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla B-1, y o bien la secuencia de CDR1 o la secuencia de CDR2 se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1. Preferiblemente, en este aspecto, la secuencia de CDR restante presente se elige de manera adecuada del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las correspondientes secuencias de CDR enumeradas en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con las correspondientes secuencias de CDR enumeradas en la tabla B-1.

Incluso más preferiblemente, en los Nanobodies de la invención, las tres secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1. Además, generalmente, se prefieren las combinaciones de CDR enumeradas en la tabla B-1 (es decir, las mencionadas en la misma línea en la tabla B-1). Por tanto, se prefiere generalmente que, cuando una CDR en un Nanobody de la invención es una secuencia de CDR mencionada en la tabla B-1 o se elige de manera adecuada del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de CDR enumerada en la tabla B-1; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con una secuencia de CDR enumerada en la tabla B-1, que al menos una y preferiblemente todas de las otras CDR se eligen adecuadamente de las secuencias de CDR que pertenecen a la misma combinación en la tabla B-1 (es decir, mencionadas en la misma línea en la tabla B-1) o se eligen adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la(s) secuencia(s) de CDR que pertenece(n) a la misma combinación y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido con la(s) secuencia(s) de CDR que pertenece(n) a la misma combinación. Las otras preferencias indicadas en los párrafos anteriores también se aplican a las combinaciones de CDR mencionadas en la tabla B-1.

Por tanto, por medio de ejemplos no limitativos, un Nanobody de la invención puede, por ejemplo, comprender una secuencia de CDR1 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla B-1, una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con una de las secuencias de CDR2 mencionadas en la tabla B-1 (pero que pertenecen a una combinación diferente), y una secuencia de CDR3.

Algunos Nanobodies preferidos de la invención pueden, por ejemplo, comprender: (1) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla B-1; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con una de las secuencias de CDR2 mencionadas en la tabla B-1 (pero que pertenecen a una combinación diferente); y una secuencia de CDR3 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR3 mencionadas en la tabla B-1 (pero que pertenecen a una combinación diferente); o (2) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla B-1; una secuencia de CDR2, y una de las secuencias de CDR3 enumeradas en la tabla B-1; o (3) una secuencia de CDR1; una secuencia de CDR2 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de la secuencia de CDR2 enumerada en la tabla B-1; y una secuencia de CDR3 que tiene 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla B-1 que pertenece a la misma combinación que la secuencia de CDR2.

Algunos Nanobodies particularmente preferidos de la invención pueden, por ejemplo, comprender: (1) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla B-1; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla B-1 que pertenece a la misma combinación; y una secuencia de CDR3 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla B-1 que pertenece a la misma combinación; (2) una secuencia de CDR1; una CDR2 enumerada en la tabla B-1 y una secuencia de CDR3 enumerada en la tabla B-1 (en la que la secuencia de CDR2 y secuencia de CDR3 pueden pertenecer a diferentes combinaciones).

Algunos Nanobodies incluso más preferidos de la invención pueden, por ejemplo, comprender: (1) una secuencia de CDR1 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla B-1; la secuencia de CDR2 enumerada en la tabla B-1 que pertenece a la misma combinación; y una secuencia de CDR3 mencionada en la tabla B-1 que pertenece a una combinación diferente; o (2) una secuencia de CDR1 mencionada en la tabla B-1; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla B-1 que pertenece a la misma combinación; y una secuencia de CDR3 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR3 enumerada en la tabla B-1 que pertenece a la misma o una combinación diferente.

Particularmente Nanobodies preferidos de la invención pueden, por ejemplo, comprender una secuencia de CDR1 mencionada en la tabla B-1, una secuencia de CDR2 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla B-1 que pertenece a la misma combinación; y la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla B-1 que pertenece a la misma combinación. En la mayoría de Nanobodies preferidos de la invención, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente de una de las combinaciones de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enumeradas en la tabla B-1.

Según otro aspecto preferido, pero no limitativo de la invención (a) CDR1 tiene una longitud de entre 1 y 12 residuos de aminoácido, y habitualmente entre 2 y 9 residuos de aminoácido, tales como 5, 6 ó 7 residuos de aminoácido; y/o (b) CDR2 tiene una longitud de entre 13 y 24 residuos de aminoácido, y habitualmente entre 15 y 21 residuos de aminoácido, tales como 16 y 17 residuos de aminoácido; y/o (c) CDR3 tiene una longitud de entre 2 y 35 residuos de aminoácido, y habitualmente entre 3 y 30 residuos de aminoácido, tales como entre 6 y 23 residuos de aminoácido.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, la invención se refiere a un Nanobody en el que las secuencias de CDR (tal como se define en el presente documento) tienen más del 80%, preferiblemente más del 90%, más preferiblemente más del 95%, tal como el 99% o más de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con las secuencias de CDR de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1).

Generalmente, los Nanobodies con las anteriores secuencias de CDR pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento, y preferiblemente tienen secuencias de región de entramado que son también tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Por tanto, por ejemplo y tal como se menciona en el presente documento, tales Nanobodies pueden ser Nanobodies que se producen de manera natural (de cualquier especie adecuada), secuencias de V_{HH} que se producen de manera natural (es decir, a partir de una especie adecuada de camélido) o Nanobodies o secuencias de inmunoglobulina sintéticas o semisintéticas, incluyendo pero sin limitarse a secuencias de V_{HH} o Nanobodies parcialmente humanizados, secuencias de V_{HH} o Nanobodies totalmente humanizados, secuencias de dominio variable de cadena pesada camelizadas, así como Nanobodies que se han obtenido mediante las técnicas mencionadas en el presente documento.

Por tanto, en un aspecto específico, pero no limitativo, la invención se refiere a un Nanobody humanizado, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en las que CDR1 a CDR3 son tal como se definen en el presente documento y en las que dicho Nanobody humanizado comprende al menos una sustitución humanizante (tal como se define en el presente documento), y en particular al menos una sustitución humanizante en al menos una de sus secuencias de región de entramado (tal como se define en el presente documento).

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, la invención se refiere a un Nanobody en el que las secuencias de CDR tienen al menos una identidad de aminoácidos del 70%, preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 80%, más preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 90%, tal como una identidad de aminoácidos del 95% o más o incluso esencialmente una identidad de aminoácidos del 100% con las secuencias de CDR de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1). Este grado de identidad de aminoácidos puede, por ejemplo, determinarse determinando el grado de identidad de aminoácidos (de una manera descrita en el presente documento) entre dicho Nanobody y una o más de las secuencias de SEQ ID

NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1), en el que los residuos de aminoácido que forman las regiones de entramado se descartan. Tales Nanobodies pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, la invención se refiere a un Nanobody con una secuencia de inmunoglobulina que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1) o del grupo que consiste en secuencias de inmunoglobulina que tienen más del 80%, preferiblemente más del 90%, más preferiblemente más del 95%, tal como el 99% o más identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1).

Otro aspecto preferido, pero no limitativo de la invención se refiere a variantes humanizadas de los Nanobodies de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1), que comprenden, en comparación con la correspondiente secuencia de V_{HH} nativa, al menos una sustitución humanizante (tal como se define en el presente documento), y en particular al menos una sustitución humanizante en al menos una de sus secuencias de región de entramado (tal como se define en el presente documento).

Los polipéptidos de la invención comprenden o consisten esencialmente en al menos un Nanobody de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de polipéptidos de la invención se dan en SEQ ID NO: 789 a 791 (véase la tabla A-3).

Tabla A-3 (si aplicable): polipéptido preferido o secuencias de compuestos (también denominadas en el presente documento secuencia con un nombre particular o SEQ ID NO: X, donde X es un número que se refiere a la secuencia de inmunoglobulina relevante):

Nombre	Función de P2X7	SEQ ID NO: X, en donde X =	Secuencia de inmunoglobulina
14D5-35GS-14D5	Potenciador (véase el ejemplo 3.11 y 3.12)	789	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSPISY AMGWYRQAPGKPRELVARIYTGATWYEDSV KGRFTISRDNQNTVYLQMNSLKSEDTAVYYC HGRVRYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSPISYAMG WYRQAPGKPRELVARIYTGATWYEDSVKGR FTISRDNQNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCHGR VRYDYWGQGTQVTVSS
13A7-35GS-13A7	Bloqueador (véase el ejemplo 3.11 y 3.12)	790	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCTASRFMLDYY DIGWFRQAPGKEREGVSCRFTNDGSTAYADS VKGRFTISRDIVKHTVYLQMNSLQPEDTAVYYC AAGPLTKRRQCVPGDFSMDFWGEGTLTVSS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGESLRLSCTA SRFMLDYYDIGWFRQAPGKEREGVSCRFTND GSTAYADSVKGRFTISRDIVKHTVYLQMNSLQ EDTAVYYCAAGPLTKRRQCVPGDFSMDFWGE GTLTVSS

8G11-35GS-8G11	Bloqueador (véase el ejemplo 3.11 y 3.12)	791	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNFFRV NTMAWYRQAPGKQRELVDITRGDRTNYADT VNGRFTISRDNVRNTVYLMNGLRPEDTAAYY CYAVIELGVLEPRDYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNFF RVNTMAWYRQAPGKQRELVDITRGDRTNYA DTVNGRFTISRDNVRNTVYLMNGLRPEDTAA YYCYAVIELGVLEPRDYWGQGTQVTVSS
----------------	---	-----	---

Será evidente para el experto que los Nanobodies que se mencionan en el presente documento como “preferidos” (o “más preferidos”, “incluso más preferidos”, etc.) son también preferidos (o más preferidos, o incluso más preferidos, etc.) para su uso en los polipéptidos descritos en el presente documento. Por tanto, los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más Nanobodies “preferidos” de la invención se preferirán generalmente, y los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más Nanobodies “más preferidos” de la invención serán generalmente más preferidos.

Generalmente, las proteínas o polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en un único Nanobody (tal como un único Nanobody de la invención) se denominarán en el presente documento proteínas o polipéptidos “monovalentes” o “constructos monovalentes”. Las proteínas y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en dos o más Nanobodies (tales como al menos dos Nanobodies de la invención o al menos un Nanobody de la invención y al menos otro Nanobody) se denominarán en el presente documento proteínas o polipéptidos “multivalentes” o “constructos multivalentes”, y estos pueden proporcionar determinadas ventajas en comparación con los correspondientes Nanobodies monovalentes de la invención. Algunos ejemplos no limitativos de tales constructos multivalentes resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

Según un aspecto específico, pero no limitativo, un polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos Nanobodies de la invención, tal como dos o tres Nanobodies de la invención. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, tales constructos multivalentes pueden proporcionar determinadas ventajas en comparación con una proteína o polipéptido que comprende o que consiste esencialmente en un único Nanobody de la invención, tal como una aidez bastante mejorada para canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7. Tales constructos multivalentes serán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento; algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales constructos de Nanobody multivalentes son los constructos de SEQ ID NO: 789 a 791.

Según otro aspecto específico, pero no limitativo, un polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanobody de la invención y al menos una otra unidad de unión (es decir, dirigida contra otro epítipo, antígeno, diana, proteína o polipéptido), que es también preferiblemente un Nanobody. Tales proteínas o polipéptidos también se denominan en el presente documento proteínas o polipéptidos “multiespecíficos” o “constructos multiespecíficos”, y estos pueden proporcionar determinadas ventajas en comparación con los Nanobodies monovalentes correspondientes de la invención (tal como resultará evidente a partir de la discusión adicional en el presente documento de algunos constructos multiespecíficos preferidos, no limitativos). Tales constructos multiespecíficos serán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento; algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales constructos de Nanobody multiespecíficos son los constructos de SEQ ID NO: 789 a 791.

Según aún otro aspecto específico, pero no limitativo, un polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos un Nanobody de la invención, opcionalmente uno o más Nanobodies adicionales, y al menos otra secuencia de inmunoglobulina (tal como una proteína o polipéptido) que confiere al menos una propiedad deseada al Nanobody de la invención y/o a la proteína de fusión resultante. De nuevo, tales proteínas de fusión pueden proporcionar determinadas ventajas en comparación con los Nanobodies monovalentes correspondientes de la invención. Algunos ejemplos no limitativos de tales secuencias de inmunoglobulina y de tales constructos de fusión resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

También es posible combinar dos o más de los aspectos anteriores, por ejemplo, para proporcionar un constructo biespecífico trivalente que comprende dos Nanobodies de la invención y otro Nanobody, y opcionalmente una o más de otras secuencias de inmunoglobulina. Los ejemplos no limitativos adicionales de tales constructos, así como algunos constructos que se prefieren particularmente dentro del contexto de la presente invención, resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

En los constructos anteriores, el uno o más Nanobodies y/u otras secuencias de inmunoglobulina pueden unirse directamente entre sí y/o universo de manera adecuada entre sí por medio de una o más secuencias de unión.

Algunos ejemplos adecuados pero no limitativos de tales ligadores resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

En un aspecto específico de la invención, un Nanobody de la invención o un compuesto, constructo o polipéptido de la invención que comprende al menos un Nanobody de la invención puede tener una semivida aumentada, en comparación con la correspondiente secuencia de inmunoglobulina de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales Nanobodies, compuestos y polipéptidos resultarán evidentes para el experto basándose en la divulgación adicional en el presente documento, y por ejemplo comprenden polipéptidos o secuencias de Nanobodies de la invención que se han modificado químicamente para aumentar la semivida de los mismos (por ejemplo, por medio de pegilación); secuencias de inmunoglobulina de la invención que comprenden al menos un sitio de unión adicional por la unión a una proteína sérica (tal como albúmina sérica, véase por ejemplo el documento EP 0 368 684 B1, página 4); o polipéptidos de la invención que comprenden al menos un Nanobody de la invención que está unido a al menos un resto (y en particular al menos una secuencia de inmunoglobulina) que aumenta la semivida del Nanobody de la invención. Los ejemplos de polipéptidos de la invención que comprenden tales restos de extensión de la semivida o secuencias de inmunoglobulina resultarán evidentes para el experto basándose en la divulgación adicional en el presente documento; y por ejemplo incluyen, sin limitación, polipéptidos en los que el uno o más Nanobodies de la invención están unidos de manera adecuada a una o más proteínas séricas o fragmentos de las mismas (tales como albúmina sérica o fragmentos adecuados de la misma) o a una o más unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas (tales como, por ejemplo, Nanobodies o anticuerpos de dominio (individual) que pueden unirse a proteínas séricas tales como albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas tales como IgG, o transferrina); polipéptidos en los que un Nanobody de la invención se une a una porción Fc (tal como un Fc humano) o una parte o fragmento adecuado de la misma; o polipéptidos en los que el uno o más Nanobodies de la invención están unidos de manera adecuada a una o más péptidos o proteínas pequeñas que pueden unirse a proteínas séricas (tales como, sin limitación, las proteínas y péptidos descritos en los documentos WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489 y a la solicitud provisional estadounidense de Ablynx N.V. titulada "Peptides capable of binding to serum proteins" de Ablynx N.V. presentada el 5 de diciembre de 2006 (véase también el documento PCT/EP/2007/063348).

De nuevo, tal como será evidente para el experto, tales Nanobodies, compuestos, constructos o polipéptidos pueden contener uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales, tales como una o más secuencias de inmunoglobulina adicionales y en particular uno o más Nanobodies adicionales (es decir, que no se dirigen contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7), para proporcionar un constructo de Nanobody trimultiespecífico.

Generalmente, los Nanobodies de la invención (o compuestos, constructos o polipéptidos que comprenden los mismos) con semivida aumentada, tienen preferiblemente una semivida que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la correspondiente secuencia de inmunoglobulina de la invención *per se*. Por ejemplo, los Nanobodies, compuestos, constructos o polipéptidos de la invención con semivida aumentada pueden tener una semivida que está aumentada con más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 ó 72 horas, en comparación con la correspondiente secuencia de inmunoglobulina de la invención *per se*.

En un aspecto preferido, pero no limitativo de la invención, tales Nanobodies, compuesto, constructos o polipéptidos de la invención presentan una semivida sérica en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más. Por ejemplo, compuestos o polipéptidos de la invención pueden tener una semivida de al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente de al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o al menos de aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente de al menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

En otro aspecto de la invención, un polipéptido de la invención comprende uno o más (tal como dos o preferiblemente uno) Nanobodies de la invención unidos (opcionalmente por medio de una o más secuencias de unión adecuadas) a una o más (tal como dos y preferiblemente una) secuencias de inmunoglobulina que permiten que el polipéptido de la invención resultante cruce la barrera hematoencefálica. En particular, dichas una o más secuencias de inmunoglobulina que permiten que los polipéptidos de la invención resultantes que cruzan la barrera hematoencefálica puedan ser uno o más (tal como dos y preferiblemente uno) Nanobodies, tales como los Nanobodies descritos en el documento WO 02/057445, de los cuales FC44 (SEQ ID NO: 189 del documento WO 06/040153) y FC5 (SEQ ID NO: 190 del documento WO 06/040154) son ejemplos preferidos.

En particular, los polipéptidos que comprenden uno o más Nanobodies de la invención son preferiblemente tales que:

- se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 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} litro/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litro/moles);

y/o tales que:

- 5 - se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad k_{on} de entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;

10 y/o tales que:

- se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad k_{off} entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ 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} .

15 Preferiblemente, un polipéptido que contiene sólo una secuencia de inmunoglobulina de la invención es preferiblemente tal que se unirá a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 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. En este respecto, resultará evidente para el experto que un polipéptido que contiene dos o más Nanobodies de la invención puede unirse a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afección aumentada, en comparación con un polipéptido que contiene sólo una secuencia de inmunoglobulina de la invención.

20 Algunos valores de CI_{50} preferidos para la unión de las secuencias de inmunoglobulina o polipéptidos de la invención a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 resultarán evidentes a partir de la descripción adicional y ejemplos en el presente documento.

Otros polipéptidos según este aspecto preferido de la invención pueden, por ejemplo, elegirse del grupo que consiste en secuencias de inmunoglobulina que tienen más del 80%, preferiblemente más del 90%, más preferiblemente más del 95%, tal como el 99% o más de "identidad de secuencia" (tal como se define en el presente documento) con una o más de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 789 a 791 (véase la tabla A-3), en las que los Nanobodies comprendidos dentro de dichas secuencias de inmunoglobulina son preferiblemente tal como se define además en el presente documento.

35 Otro aspecto de esta invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para una secuencia de inmunoglobulina de la invención (tal como un Nanobody de la invención) o un polipéptido de la invención que comprende el mismo. De nuevo, tal como se describe generalmente en el presente documento para los ácidos nucleicos de la invención, un ácido nucleico de este tipo puede estar en forma de un constructo genético, tal como se define en el presente documento.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un huésped o célula huésped que expresa o que es capaz de expresar una secuencia de inmunoglobulina (tal como un Nanobody) de la invención y/o un polipéptido de la invención que comprende la misma; y/o que contiene un ácido nucleico de la invención. Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de tales huéspedes o células huésped resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a un producto o composición que contiene o que comprende al menos una secuencia de inmunoglobulina de la invención, al menos un polipéptido de la invención y/o al menos un ácido nucleico de la invención, y opcionalmente uno o más componentes adicionales de tales composiciones conocidos *per se*, es decir, según el uso previsto de la composición. Un producto o composición de este tipo puede, por ejemplo, ser una composición farmacéutica (tal como se describe en el presente documento), una composición veterinaria o un producto o composición para uso diagnóstico (tal como también se describe en el presente documento). Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de tales productos o composiciones resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

55 La invención se refiere además a métodos para preparar o generar las secuencias de inmunoglobulina, compuestos, constructos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento. Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de tales métodos resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

60 La divulgación se refiere además a aplicaciones y usos de las secuencias de inmunoglobulina, compuestos, constructos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento, así como a métodos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7. Algunas aplicaciones y usos preferidos pero no limitativos resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

65 Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la divulgación también resultarán evidentes a partir de la

descripción adicional a continuación en el presente documento. Generalmente, debe indicarse que el término Nanobody tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio no se limita a una fuente biológica específica o a un método específico de preparación. Por ejemplo, tal como se comentará en más detalle a continuación, los Nanobodies de la divulgación pueden obtenerse generalmente mediante cualquiera de las técnicas (1) a (8) mencionadas en las páginas 61 y 62 del documento WO 08/020079, o cualquier otra técnica adecuada conocida *per se*. Una clase preferida de Nanobodies se corresponde con los dominios de V_{HH} de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural dirigidos contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, tales secuencias de V_{HH} pueden generarse u obtenerse generalmente inmunizando de manera adecuada una especie de camélido con canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 (es decir, para producir una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7), obteniendo una muestra biológica adecuada de dicho camélido (tal como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de células B), y generando secuencias de V_{HH} dirigidas contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, a partir de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*. Tales técnicas serán evidentes para el experto y/o se describen adicionalmente en el presente documento.

Alternativamente, Tales dominios de V_{HH} que se producen de manera natural contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, pueden obtenerse de bibliotecas no expuestas de secuencias de camélido de V_{HH} , por ejemplo, seleccionando una biblioteca de este tipo usando canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, o al menos una parte, fragmento, determinante antigénico o epítipo de los mismos usando una o más técnicas de selección conocidas *per se*. Tales bibliotecas y técnicas se describen, por ejemplo, en los documentos WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 y WO 03/035694. Alternativamente, pueden usarse bibliotecas sintéticas o semisintéticas mejoradas derivadas de las bibliotecas de V_{HH} no expuestas, tales como bibliotecas de V_{HH} obtenidas de bibliotecas de V_{HH} no expuestas mediante técnicas tales como mutagénesis aleatoria y/o intercambio de CDR, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/43507.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para generar Nanobodies, que se dirigen contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7. En un aspecto, dicho método comprende al menos las etapas de:

- a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody; y
- b) examinar dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody para secuencias de Nanobody que pueden unirse a y/o tener afinidad por canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7; y
- c) aislar el Nanobody o Nanobodies que pueden unirse a y/o tener afinidad por canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

En un método de este tipo, el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody puede ser un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody no expuesta; un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody sintéticas o semisintéticas; y/o un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody se han sometido a maduración de afinidad.

En un aspecto preferido de este método, el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody puede ser un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody inmunitaria, y en particular un conjunto, colección o biblioteca inmunitaria de secuencias de V_{HH} , que han derivado de una especie de camélido que se ha inmunizado adecuadamente con canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 o con un determinante antigénico adecuado basado en los mismos o derivado de los mismos, tal como una parte, fragmento, región, dominio, bucle u otro epítipo antigénico de los mismos. En un aspecto particular, dicho determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro(s) epítipo(s) extracelular(es).

En los métodos anteriores, el conjunto, colección o biblioteca de Nanobody o secuencias de V_{HH} puede presentarse en un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), tal como para facilitar el examen. Los métodos, técnicas y organismos huésped adecuados para presentar y examinar (un conjunto, colección o biblioteca de) secuencias de Nanobody resultarán evidentes para el experto en la técnica, por ejemplo basándose en la divulgación adicional en el presente documento. También se hace referencia al documento WO 03/054016 y a la revisión de Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

En otro aspecto, el método para generar secuencias de Nanobody comprende al menos las etapas de:

- a) proporcionar una colección o muestra de células derivadas de una especie de camélido que expresan secuencias de inmunoglobulina;
- b) examinar dicha colección o muestra de células para (i) células que expresan una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tener afinidad por canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7; y (ii) células que expresan anticuerpos de cadena pesada, en donde pueden realizarse las subetapas (i) y (ii) esencialmente como una etapa de examen único o en cualquier orden adecuado como dos etapas de examen diferenciadas, para proporcionar al

menos una célula que expresa un anticuerpo de cadena pesada que puede unirse a y/o tiene afinidad por canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7; y

- 5 c) o bien (i) aislar de dicha célula la secuencia de V_{HH} presente en dicho anticuerpo de cadena pesada; o bien (ii) aislar de dicha célula una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de V_{HH} presente en dicho anticuerpo de cadena pesada, seguido por expresión de dicho dominio de V_{HH} .

10 En el método según este aspecto, la colección o muestra de células puede, por ejemplo, ser una colección o muestra de células B. Además, en este método, la muestra de células puede derivar de un camélido que se ha inmunizado adecuadamente con canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 o un determinante antigénico adecuado basado en los mismos o derivado de los mismos, tal como una parte, fragmento, región, dominio, bucle u otro epítipo antigénico de los mismos. En un aspecto particular, dicho determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro(s) epítipo(s) extracelular(es).

15 El método anterior puede realizarse en cualquier manera adecuada, tal como será evidente para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 y WO 04/106377. El examen de la etapa b) se realiza preferiblemente usando una técnica de citometría de flujo tal como FACS. Para esto, se hace referencia, por ejemplo, a Lieby *et al.*, Blood, Vol. 97, n.º 12, 3820. Se hace referencia particular a la técnica denominada "Nanoclone™" descrita en la solicitud internacional WO 06/079372 de Ablynx N.V.

20 En otro aspecto, el método para generar una secuencia de inmunoglobulina dirigida contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 puede comprender al menos las etapas de:

25 a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifican para anticuerpos de cadena pesada o secuencias de Nanobody;

b) examinar dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico para secuencias de ácido nucleico que codifican para un anticuerpo de cadena pesada o una secuencia de Nanobody que puede unirse a y/o tiene afinidad por canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7; y

30 c) aislar dicha secuencia de ácido nucleico, seguido por la expresión de la secuencia de V_{HH} presente en dicho anticuerpo de cadena pesada o expresando dicha secuencia de Nanobody, respectivamente.

35 En un método de este tipo, el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifican para anticuerpos de cadena pesada o secuencias de Nanobody puede, por ejemplo, ser un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifican para un conjunto, colección o biblioteca de anticuerpos de cadena pesada o secuencias de V_{HH} no expuesta; un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifican para un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody sintéticas o semisintéticas; y/o un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifican para un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de Nanobody que se han sometido a maduración de afinidad.

40 En un aspecto preferido de este método, el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico puede ser un conjunto, colección o biblioteca inmunitaria de secuencias de ácido nucleico que codifica para anticuerpos de cadena pesada o secuencias de V_{HH} derivadas de un camélido que se ha inmunizado adecuadamente con canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 o con un determinante antigénico adecuado basado en los mismos o derivado de los mismos, tal como una parte, fragmento, región, dominio, bucle u otro epítipo antigénico de los mismos. En un aspecto particular, dicho determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro(s) epítipo(s) extracelular(es).

50 En los métodos anteriores, el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de nucleótidos puede presentarse en un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), tal como para facilitar el examen. Los métodos, técnicas y organismos huésped adecuados para presentar y examinar (un conjunto, colección o biblioteca de) secuencias de nucleótidos que codifican para secuencias de inmunoglobulina serán evidentes para el experto en la técnica, por ejemplo basándose en la divulgación adicional en el presente documento. También se hace referencia al documento WO 03/054016 y a la revisión de Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

55 Tal como será evidente para el experto, la etapa de examen de los métodos descritos en el presente documento también puede realizarse como una etapa de selección. Por consiguiente el término "examen" tal como se usa en la presente descripción puede comprender selección, examen o cualquier combinación adecuada de técnicas de selección y/o examen. Además, cuando se usa un conjunto, colección o biblioteca de secuencias, puede contener cualquier número de secuencias adecuado, tal como 1, 2, 3 o aproximadamente 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o más secuencias.

65 Además, pueden obtenerse o definirse una o más o todas las secuencias en el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina anterior mediante enfoques racionales o semiempíricos tales como técnicas de modelado informático o bioestadística o técnicas de extracción de datos.

Además, un conjunto, colección o biblioteca de este tipo puede comprender una, dos o más secuencias que son variantes entre sí (por ejemplo, con mutaciones puntuales designadas o con posiciones aleatorizadas), comprenden múltiples secuencias derivadas de un conjunto diverso de secuencias diversificadas de manera natural (por ejemplo, una biblioteca inmunitaria)), o cualquier otra fuente de secuencias diversas (tal como se describe, por ejemplo, en Hoogenboom *et al*, Nat Biotechnol 23:1105, 2005 y Binz *et al*, Nat Biotechnol 2005, 23:1247). Tal conjunto, colección o biblioteca de secuencias puede presentarse sobre la superficie de una partícula de fago, un ribosoma, una bacteria, una célula de levadura, una célula de mamífero, y unirse a la secuencia de nucleótidos que codifican para la secuencia de inmunoglobulina dentro de estos portadores. Esto hace que tal conjunto, colección o biblioteca sea susceptible a procedimientos de selección para aislar las secuencias de inmunoglobulina deseadas de la divulgación. Más generalmente, cuando se presenta una secuencia en un huésped o célula huésped adecuada, también es posible (y habitual) aislar en primer lugar de dicho huésped o célula huésped una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia deseada, y obtener entonces la secuencia deseada expresando de manera adecuada dicha secuencia de nucleótidos en un organismo huésped adecuado. De nuevo, esto puede realizarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, tal como será evidente para el experto.

Aún otra técnica para obtener secuencias de V_{HH} o secuencias de Nanobody dirigidas contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 implica inmunizar de manera adecuada un mamífero transgénico que es capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para producir una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7), obtener una muestra biológica adecuada de dicho mamífero transgénico que contiene (secuencias de ácido nucleico que codifican para) dichas secuencias de V_{HH} o secuencias de Nanobody (tal como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de células B), y luego generar secuencias de V_{HH} dirigidas contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, a partir de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida *per se* (tal como cualquiera de los métodos descritos en el presente documento o una técnica de hibridoma). Por ejemplo, para este propósito, pueden usarse los ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritas en los documentos WO 02/085945, WO 04/049794 y WO 06/008548 y Janssens *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 10 de octubre de 2006;103(41):15130-. Por ejemplo, tales ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada pueden expresar anticuerpos de cadena pesada con cualquier dominio variable (individual) adecuado, tal como dominios variables (individuales) de fuentes naturales (por ejemplo (dominios variables (individuales) humanos, dominios variables (individuales) de camélido o dominios variables (individuales) de tiburón), así como, por ejemplo, dominios variables (individuales) sintéticos o semisintéticos.

La divulgación también se refiere a las secuencias de V_{HH} o secuencias de Nanobody que se obtienen mediante los métodos anteriores, o alternativamente mediante un método que comprende uno de los métodos anteriores y además al menos las etapas de determinar la secuencia de nucleótidos o secuencia de inmunoglobulina de dicha secuencia de V_{HH} o secuencia de Nanobody; y de expresar o sintetizar dicha secuencia de V_{HH} o secuencia de Nanobody de manera conocida *per se*, tal como mediante expresión en una célula huésped u organismo huésped adecuado o mediante síntesis química.

Tal como se menciona en el presente documento, una clase particularmente preferida de Nanobodies de la divulgación comprende Nanobodies con una secuencia de inmunoglobulina que se corresponde con la secuencia de inmunoglobulina de un dominio de V_{HH} que se produce de manera natural, pero que se ha "humanizado", es decir reemplazando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de inmunoglobulina de dicha secuencia de V_{HH} que se produce de manera natural (y en particular en las secuencias de región de entramado) en uno o más de los residuos de aminoácido que se producen en la(s) correspondiente(s) posición/posiciones en un dominio de V_H de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (por ejemplo, tal como se indica anteriormente), tal como se describe adicionalmente en, y usando las técnicas mencionadas en, la página 63 del documento WO 08/020079. Otra clase particularmente preferida de Nanobodies de la divulgación comprende Nanobodies con una secuencia de inmunoglobulina que se corresponde con la secuencia de inmunoglobulina de un dominio de V_H que se produce de manera natural, pero que se ha "camelizado", es decir reemplazando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de inmunoglobulina de un dominio de V_H que se produce de manera natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional en uno o más de los residuos de aminoácido que se producen en la(s) correspondiente(s) posición/posiciones en un dominio de V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada, tal como se describe adicionalmente en, y usando las técnicas mencionadas en, la página 63 del documento WO 08/020079.

Otros métodos y técnicas adecuados para obtener los Nanobodies de la divulgación y/o ácidos nucleicos que codifican para los mismos, a partir de secuencias de V_{HH} que se producen de manera natural, serán evidentes para el experto, y pueden por ejemplo incluir las técnicas que se mencionan en la página 64 del documento WO 08/00279. Tal como se menciona en el presente documento, los Nanobodies pueden en particular caracterizarse por la presencia de uno o más "residuos distintivos" (tal como se describe en el presente documento) en una o más de las secuencias de región de entramado.

Por tanto, según un aspecto preferido, pero no limitativo de la divulgación un Nanobody en su sentido más amplio puede definirse generalmente como un polipéptido que comprende:

a) una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las que el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

5 y/o:

b) una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las que el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es un aminoácido cargado (tal como se define en el presente documento) o un residuo de cisteína, y la posición 44 es preferiblemente una E;

10

y/o:

c) una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las que el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S, y se elige en particular del grupo que consiste en R y S.

15

Por tanto, en un primer aspecto, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede tener la estructura

20

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

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

25

a) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q; y/o en la que:

b) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es un aminoácido cargado o una cisteína y el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat es preferiblemente E;

30

y/o en la que:

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

35

y en la que:

d) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

40

En particular, un Nanobody en su sentido más amplio puede definirse generalmente como un polipéptido que comprende:

a) una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las que el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

45

y/o:

b) una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las que el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat es E y en la que el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es una R;

50

y/o:

c) una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las que el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en P, R y S, y se elige en particular del grupo que consiste en R y S.

60

Por tanto, según un aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede tener la estructura

65

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

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

a) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

y/o en la que:

b) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat es E y en la que el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es una R;

y/o en la que:

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

y en la que:

d) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En particular, un Nanobody contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 según la divulgación puede tener la estructura:

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

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

a) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

y/o en la que:

b) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat es E y en la que el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es una R;

y/o en la que:

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

y en la que:

d) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En particular, según un aspecto preferido, pero no limitativo de la divulgación, un Nanobody puede definirse generalmente como un polipéptido que comprende una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en las que;

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

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

a-3) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en W, R o S; y es preferiblemente W o R, y es lo más preferiblemente W;

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

o en las que:

b-1) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en E

y Q; y

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

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

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

10 o en las que:

c-1) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en A, G, E, D, Q, R, S y L; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en G, E y Q; y

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

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

c-4) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en Q y L; es preferiblemente Q; y en las que

25 d) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede tener la estructura

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

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

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

y en la que:

40 a-2) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en L, R o C; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en L o R;

y en la que:

45 a-3) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en W, R o S; y es preferiblemente W o R, y es lo más preferiblemente W;

y en la que

50 a-4) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat es Q;

y en la que:

55 d) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede tener la estructura

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

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

65 b-1) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en E

y Q;

y en la que:

5 b-2) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es R;

y en la que:

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

y en la que:

15 b-4) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en Q y L; y es preferiblemente Q;

y en la que:

20 d) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede tener la estructura

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

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

30 c-1) el residuo de aminoácido en la posición 44 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en A, G, E, D, Q, R, S y L; y se elige preferiblemente del grupo que consiste en G, E y Q;

y en la que:

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

y en la que:

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

y en la que:

45 c-4) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en Q y L; es preferiblemente Q; y en la que:

50 d) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Dos grupos particularmente preferidos, pero no limitativos de los Nanobodies de la divulgación son aquellos según a) anterior; según (a-1) a (a-4) anterior; según b) anterior; según (b-1) a (b-4) anterior; según (c) anterior; y/o según (c-1) a (c-4) anterior, en los que o bien:

55 i) los residuos de aminoácido en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW (o una secuencia tipo GLEW tal como se describe en el presente documento) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

60 o bien en la que:

ii) los residuos de aminoácido en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat forman la secuencia KERE o KQRE (o una secuencia tipo KERE tal como se describe) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q o L, y es preferiblemente Q.

65 Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede tener la estructura

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

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

i) los residuos de aminoácido en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW (o una secuencia tipo GLEW tal como se define en el presente documento) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

y en la que:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede tener la estructura

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

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

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

y en la que:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En los Nanobodies de la divulgación en los que los residuos de aminoácido en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat forman la secuencia KERE o KQRE, el residuo de aminoácido en la posición 37 es lo más preferiblemente F. En los Nanobodies de la divulgación en los que los residuos de aminoácido en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat forman la secuencia GLEW, el residuo de aminoácido en la posición 37 se elige del grupo que consiste en Y, H, I, L, V o F, y es lo más preferiblemente V.

Por tanto, sin limitarse a lo mismo en modo alguno, basándose en los residuos de aminoácido presentes en las posiciones mencionadas anteriormente, los Nanobodies de la divulgación pueden clasificarse generalmente basándose en los siguientes tres grupos:

i) el "grupo GLEW": Nanobodies con la secuencia de inmunoglobulina GLEW en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat y Q en la posición 108 según la numeración de Kabat. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, los Nanobodies dentro de este grupo tienen habitualmente una V en la posición 37, y pueden tener una W, P, R o S en la posición 103, y preferiblemente tienen una W en la posición 103. El grupo GLEW también comprende algunas secuencias tipo GLEW tales como las mencionadas en la tabla B-2 a continuación. Más generalmente, y sin limitación, los Nanobodies que pertenecen al grupo GLEW pueden definirse como Nanobodies con una G en la posición 44 y/o con una W en la posición 47, en la que posición 46 es habitualmente E y en la que preferiblemente la posición 45 no es un residuo de aminoácido cargado y no es cisteína;

ii) el "grupo KERE": Nanobodies con la secuencia de inmunoglobulina KERE o KQRE (u otra secuencia tipo KERE) en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat y Q o L en la posición 108 según la numeración de Kabat. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, los Nanobodies dentro de este grupo tienen habitualmente una F en la posición 37, una L o F en la posición 47; y pueden tener una W, P, R o S en la posición 103, y preferiblemente tienen una W en la posición 103. Más generalmente, y sin limitación, los Nanobodies que pertenecen al grupo KERE pueden definirse como Nanobodies con una K, Q o R en la posición 44 (habitualmente K) en la que la posición 45 es un residuo de aminoácido cargado o cisteína, y la posición 47 es tal como se define además en el presente documento;

iii) el "grupo P, R, S 103": Nanobodies con una P, R o S en la posición 103. Estos Nanobodies pueden tener o bien la secuencia de inmunoglobulina GLEW en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat o bien la secuencia de inmunoglobulina KERE o KQRE en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat, lo último lo más preferiblemente en combinación con una F en la posición 37 y una L o una F en la posición 47 (tal como se define para el grupo KERE); y pueden tener Q o L en la posición 108 según la numeración de Kabat, y tienen preferiblemente Q.

Además, cuando sea apropiado, los Nanobodies que pertenecen a (es decir, tienen características de) dos o más de estas clases. Por ejemplo, un grupo específicamente preferido de Nanobodies tiene GLEW o una secuencia tipo GLEW en las posiciones 44-47; P, R o S (y en particular R) en la posición 103; y Q en la posición 108 (que puede humanizarse a L).

Más generalmente, debe indicarse que las definiciones a las que se hace referencia anteriormente describen y se aplican a Nanobodies en forma de una secuencia de V_{HH} nativa (es decir, no humanizada), y que las variantes humanizadas de estos Nanobodies pueden contener otros residuos de aminoácido que los indicados anteriormente (es decir, una o más sustituciones humanizantes tal como se define en el presente documento). Por ejemplo, y sin limitación, en algunos Nanobodies humanizados del grupo GLEW o el grupo P, R, S, Q 103 en la posición 108 puede humanizarse a 108L. Tal como ya se menciona en el presente documento, otras sustituciones humanizantes (y combinaciones adecuadas de las mismas) resultarán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Además, o alternatively, pueden determinarse otras sustituciones humanizantes potencialmente útiles comparando la secuencia de las regiones de entramado de una secuencia de V_{HH} que se produce de manera natural con la correspondiente secuencia de región de entramado de una o más secuencias de V_H humanas estrechamente relacionadas, tras lo cual una o más de las posibles sustituciones humanizantes útiles (o combinaciones de las mismas) así determinadas pueden introducirse en dicha secuencia de V_{HH} (de cualquier manera conocida *per se*, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) y las secuencias de V_{HH} humanizadas resultantes pueden someterse a prueba para determinar la afinidad por la diana, por la estabilidad, por facilidad y nivel de expresión, y/o por otras propiedades deseadas. De este modo, por medio de un grado limitado de ensayo y error, pueden determinarse otras sustituciones humanizantes adecuadas (o combinaciones adecuadas de las mismas) por el experto basándose en la divulgación en el presente documento. Además, basándose en lo anterior, (las regiones de entramado de) un Nanobody pueden humanizarse parcialmente o humanizarse totalmente.

Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede ser un Nanobody que pertenece al grupo GLEW (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede ser un Nanobody que pertenece al grupo KERE (tal como se define en el presente documento), y CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede ser un Nanobody que pertenece al grupo P, R, S 103 (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Además, más generalmente y además de los residuos 108Q, 43E/44R y 103 P,R,S mencionados anteriormente, los Nanobodies de la divulgación pueden contener, en una o más posiciones que en un dominio de V_H convencional formaría (parte de) la interfase V_H/V_L , uno o más residuos de aminoácido que están más cargados que los residuos de aminoácido que se producen de manera natural en la(s) misma(s) posición/posiciones en la correspondiente secuencia de V_H que se produce de manera natural, y en particular uno o más residuos de aminoácido cargados (tal como se menciona en la tabla A-2 en la página 48 de la solicitud internacional WO 08/020079). Tales sustituciones incluyen, pero no se limitan a, las secuencias tipo GLEW mencionadas en la tabla B-2 a continuación; así como las sustituciones que se describen en la solicitud internacional WO 00/29004 para los denominados "microcuerpos", por ejemplo para obtener un Nanobody con Q en la posición 108 en combinación con KLEW en las posiciones 44-47. Otras posibles sustituciones en estas posiciones serán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento. En un aspecto de los Nanobodies de la divulgación, el residuo de aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste en L, M, S, V y W; y es preferiblemente L. Además, en un aspecto de los Nanobodies de la divulgación, el residuo de aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste en R, K, N, E, G, I, T y Q; y es lo más preferiblemente o bien K o bien E (para Nanobodies correspondientes a dominios de V_{HH} que se producen de manera natural) o R (para Nanobodies "humanizados", tal como se describe en el presente documento). El residuo de aminoácido en la posición 84 se elige del grupo que consiste en P, A, R, S, D T, y V en un aspecto, y es lo más preferiblemente P (para Nanobodies correspondientes a dominios de V_{HH} que se producen de manera natural) o R (para Nanobodies "humanizados", tal como se describe en el presente documento). Además, en un aspecto de los Nanobodies de la divulgación, el residuo de aminoácido en la posición 104 se elige del grupo que consiste en G y D; y es lo más preferiblemente G.

En conjunto, los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108, que en los Nanobodies son tal como se menciona anteriormente, también se denominarán en el presente documento "residuos

distintivos". Los residuos distintivos y los residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes del dominio de V_H humano más estrechamente relacionado, V_H3, se resumen en la tabla B-2.

- 5 Algunas combinaciones especialmente preferidas pero no limitativas de estos residuos distintivos tal como se produce en dominios de V_{HH} que se producen de manera natural se mencionan en la tabla B-3. Para comparación, los correspondientes residuos de aminoácido del V_H3 humano denominado DP-47 se han indicado en cursiva.

Tabla B-2: residuos distintivos en Nanobodies

Posición	V _H 3 humano	Residuos distintivos
11	L, V; predominantemente L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferiblemente L
37	V, I, F; habitualmente V	F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F ⁽¹⁾ o Y
44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; preferiblemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q ⁽³⁾ lo más preferiblemente G ⁽²⁾ o Q ⁽³⁾
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾
47 ⁽⁸⁾	W, Y	F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ o W ⁽²⁾ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾
83	R o K; habitualmente R	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; más preferiblemente K
84	A, T, D; predominantemente A	P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P
103	W	W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; preferiblemente W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G
108	L, M o T; predominantemente L	Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L ⁽⁷⁾

Notas:

⁽¹⁾ En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

⁽²⁾ Habitualmente como GLEW en las posiciones 44-47.

⁽³⁾ Habitualmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, por ejemplo, como KEREL, KERE^F, KQREL, KQREF, KERE^G, KQREW o KQREG en las posiciones 43-47. Alternativamente, también secuencias tales como TERE (por ejemplo, TEREL), TQRE (por ejemplo, TQREL), KECE (por ejemplo, KEC^EL o KECER), KQCE (por ejemplo, KQCEL), RERE (por ejemplo, REREG), RQRE (por ejemplo, RQREL, RQREF o RQREW), QERE (por ejemplo, QEREG), QQRE (por ejemplo, QQREW, QQREL o QQREF), KGRE (por ejemplo, KGREG), KDRE (por ejemplo, KDREV) son posibles. Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas, incluyen, por ejemplo, DECKL y NVCEL.

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

⁽⁵⁾ A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios de V_{HH} que se producen de manera natural.

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

⁽⁷⁾ Con la condición de que cuando las posiciones 44-47 son GLEW, la posición 108 siempre es Q en secuencias de V_{HH} (no humanizadas) que también contienen una W en 103.

⁽⁸⁾ El grupo GLEW también contiene secuencias similares a GLEW en las posiciones 44-47, tal como por ejemplo GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER y ELEW.

Tabla B-3: Algunas combinaciones preferidas pero no limitativas de residuos distintivos en Nanobodies que se producen de manera natural.

Para la humanización de estas combinaciones, se hace referencia a la memoria descriptiva.

	11	37	44	45	47	83	84	103	104	1108
DP-47 (humano)	M	V	G	L	W	R	A	W	G	L
Grupo "KERE"	L	F	E	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	E	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
	L	Y	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	L	R	V	K	P	Q	G	Q
	L	F	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
Grupo "GLEW"	L	V	G	L	W	K	S	W	G	Q
	M	V	G	L	W	K	P	R	G	Q

En los Nanobodies, cada residuo de aminoácido en cualquier otra posición que los residuos distintivos puede ser cualquier residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la correspondiente posición (según la numeración de Kabat) de un dominio de V_{HH} que se produce de manera natural.

Tales residuos de aminoácido serán evidentes para el experto. Las tablas B-4 a B-7 mencionan algunos residuos no limitativos que pueden estar presentes en cada posición (según la numeración de Kabat) de FR1, FR2, FR3 y FR4 de dominios de V_{HH} que se producen de manera natural. Para cada posición, el residuo de aminoácido que se produce lo más frecuentemente en cada posición de un dominio de V_{HH} que se produce de manera natural (y que es el residuo de aminoácido más preferido para dicha posición en un Nanobody) se indica en negrita; y otros residuos de aminoácido preferidos para cada posición se han subrayado (nota: el número de residuos de aminoácido que se encuentran en las posiciones 26-30 de dominios de V_{HH} que se producen de manera natural respalda la hipótesis subyacente de la numeración de Chothia (anteriormente) de que los residuos en estas posiciones ya forman parte de CDR1).

En las tablas B-4 - B-7, algunos de los residuos no limitativos que pueden estar presentes en cada posición de un dominio de V_{H3} humano también se han mencionado. De nuevo, para cada posición, el residuo de aminoácido que se produce lo más frecuentemente en cada posición de un dominio de V_{H3} humano que se produce de manera natural se indica en negrita; y otros residuos de aminoácido preferidos se han subrayado.

Sólo como referencia, las tablas B-4-B-7 también contienen datos sobre la entropía de V_{HH} ("ent. de V_{HH} ") y variabilidad de V_{HH} ("var. de V_{HH} ") en cada posición de aminoácido para una muestra representativa de 7732 secuencias de V_{HH} (incluyendo datos a.o. proporcionados amablemente por David Lutje Hulsing y Prof. Theo Verrips de la Universidad de Utrecht). Los valores para la entropía de V_{HH} y la variabilidad de V_{HH} proporcionan una medida para la variabilidad y el grado de conservación de residuos de aminoácido entre las 7732 secuencias de V_{HH} analizadas: valores bajos (es decir <1 , tal como $<0,5$) indican que un residuo de aminoácido está altamente conservado entre las secuencias de V_{HH} (es decir, poca variabilidad). Por ejemplo, la G en la posición 9 y la W en la posición 36 tienen valores para la entropía de V_{HH} de 0,01 y 0 respectivamente, lo que indica que estos residuos están altamente conservados y tienen poca variabilidad (y en el caso de la posición 36 es W en todas las 7732 secuencias analizadas), mientras que para residuos que forman parte de las CDR, se encuentran generalmente valores de 1,5 o más (datos no mostrados).

Obsérvese que los datos representados a continuación respaldan la hipótesis de que los residuos de aminoácido en las posiciones 27-30 y puede que incluso también en las posiciones 93 y 94 ya forman parte de las CDR (aunque la invención no se limita a ninguna hipótesis o explicación específica, y tal como se menciona anteriormente, en el presente documento se usa la numeración según Kabat). Para una explicación general de entropía de secuencia, variabilidad de secuencia y la metodología para determinar las mismas, véase Oliveira *et al.*, PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 52: 544-552 (2003).

Tabla B-4: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR1 (para las notas a pie de página, véanse las notas a pie de página en la tabla B-2)

Pos.	Residuo(s) de aminoácido:		Ent. de V_{HH}	Var. de V_{HH}
	V_{H3} humano	V_{HH} de camélido		
1	E, <u>Q</u>	E, <u>Q</u> , K, D, A, G, R	0,47	5
2	V	V, M, A, E, L	0,04	1
3	Q	Q, K, P, H, F, R	0,04	1
4	L	L, M, Q, P, R, F, V	0,02	1
5	V, L	V, <u>Q</u> , M, E, A, L, P, K, R	0,35	3
6	E	E, A, Q, D, K, H	0,21	5
7	S, T	S, F, L, W, T	0,05	2
8	G, R	G, R, E, V	0,04	1
9	G	G, R, V, A	0,01	1
10	G, V	G, D, R, S, K, E, A, Q, N, T, V	0,22	4
11	Residuo distintivo: L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferiblemente L		0,35	4
12	V, Y	V, A, L, M, E, G, T	0,11	2
13	Q, K, R	Q, <u>L</u> , R, H, P, E, K, T, S, V, D, G, A, N, M	0,46	3
14	P	A, <u>P</u> , T, V, S, D, F, N, I, E, L, R, G, Y, Q, H	0,92	5
15	G	G, E	0	1
16	G, <u>R</u>	G, <u>D</u> , E, A, S, N, V, R, K, T, P, C, L	0,47	4
17	S	S, F, P, Y, T, A, C, R, N	0,14	2
18	L	L, V, R, M, P, Q, S, A, T, K, H	0,06	1
19	R, K	R, T, K, S, N, G, A, I, L, Q, F, E, V, M	0,36	4
20	L	L, F, V, I, P, H, S	0,18	3
21	S	S, A, T, P, F, V, H, D, R, L, I, G	0,13	3
22	C	C, W	0	1
23	A, T	A, <u>V</u> , <u>I</u> , E, S, L, G, I, K, Q, R, D, F, N, P, M	0,88	5
24	A	A, D, V, T, H, Y, P, G, S, F, L, I, N, Q, E, R	0,78	9

Tabla B-4: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR1 (continuación)

Pos.	Residuo(s) de aminoácido:		Ent. de V_{HH}	Var. de V_{HH}
	V_{H3} humano	V_{HH} de camélido		
25	S	S, P, T, A, F, L, N, Y, R, H, D, V, I, W, G, K, Q, C	0,2	2
26	G	G, E, R, V, T, A, S, K, D, L, I, Q, N, F, Y, M, W, P, H	0,45	6
27	F	R, <u>E</u> , <u>S</u> , <u>P</u> , L, G, I, N, T, D, H, V, E, A, Y, K, M, Q, W, C	1,89	12
28	T	T, <u>I</u> , <u>S</u> , A, P, F, D, N, V, R, M, L, G, Y, K, E, H, W, Q	1,29	12
29	F, <u>V</u>	F, <u>L</u> , S, V, I, A, W, Y, G, D, R, T, P, N, E, M, H, Q, K, C	1,23	11
30	S, <u>D</u> , G	S, <u>D</u> , <u>N</u> , <u>G</u> , <u>R</u> , T, A, E, I, Y, K, V, H, L, F, W, M, P, C, Q	1,55	12

- 5 Tabla B-5: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR2 (para las notas a pie de página, véanse las notas a pie de página de la tabla B-2)

Pos.	Residuo (s) de aminoácido:		Ent. de V_{HH}	Var. de V_{HH}
	V_{H3} humano	V_{HH} de camélido		
36	W	W	0	1

37	Residuo distintivo: F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F ⁽¹⁾ o Y		1,1	7
38	R	R, H, C, P, Y, L, V	0,01	1
39	Q	Q, E, R, H, L, A, S, K, P, V, T, D	0,22	3
40	A	A, V, T, P, G, S, D, I, L, R, N, F, Y, C, E, H	0,55	6
41	P, S, T	P, S, A, L, T, Q, R, V, D, G, I, H	0,18	3
42	G	G, E, A, R, D, V, W, T, Q, K, L, N, H, M	0,1	2
43	K	K, N, Q, E, R, T, L, S, M, D, G, A, V, H, I, F, P	0,45	7
44	Residuo distintivo: E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; preferiblemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q ⁽³⁾ ; más preferiblemente G ⁽²⁾ o G ⁽³⁾ .		1,11	4
45	Residuo distintivo: L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾		0,56	3
46	E, V	E, D, A, Q, V, M, K, T, G, R, S, N, I, L, F	0,42	4
47	Residuo distintivo: F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ o W ⁽²⁾ , G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾		1,64	11
48	V	V, I, L, A, T, Q, F, M, G, E, R	0,35	5
49	S, A, G	A, S, G, T, V, L, C, I, F, P, E, Y, M, D, R	0,89	5

Tabla B-6: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR3 (para las notas al pie, véanse las notas al pie de la tabla B-2)

Pos.	Residuo(s) de aminoácido:		Ent. de V _{HH}	Var. de V _{HH}
	V _{H3} humano	V _{HH} de camélido		
66	R	R	0	1
67	F	F, S, L, V, I, C, A, Y, M, G	0,1	1
68	T	T, A, S, I, F, V, P, N, G, R, K, M, D, L, W, Q	0,34	4
69	I	I, V, M, T, L, A, F, P, S, G, N	0,5	5
70	S	S, T, A, F, P, V, Y, L, D, G, N, H, W, E, C	0,22	4
71	R	R, S, K, G, T, I, W, A, N, V, E, L, M, F, D, Q, C	0,61	7
72	D, E	D, N, E, G, V, A, H, L, S, T, I, Q, F, P, Y, R	0,34	4
73	N, D, G	N, D, S, K, I, Y, G, T, H, R, A, V, F, L, E, M, P, C	0,65	9
74	A, S	A, T, V, S, F, G, D, P, N, I, R, L, Y, H, E, Q, K, W, M	0,8	8
75	K	K, N, E, R, Q, A, G, T, M, S, L, D, V, W, Y, I	0,71	6
76	N, S	N, K, S, R, D, T, H, G, E, A, Y, I, M, Q, L, W, P, F, V	0,66	7
77	S, T, I	T, A, M, S, R, I, V, L, P, E, N, K, G, W, Q	0,72	7
78	L, A	V, L, A, M, I, G, T, F, W, Q, S, E, N, H	1,11	6
79	Y, H	Y, F, D, S, H, N, T, A, L, W, V, C, G, E, I, P, R	0,68	8
80	L	L, M, V, P, F	0,05	2
81	Q	Q, E, R, H, L, D, T, G, K, P, A, I, S, N, Y, V, M	0,38	4
82	M	M, I, L, V, A, T, S, K	0,12	3
82a	N, G	N, S, D, T, E, H, K, I, A, G, R, Y, L, V, F, Q	0,77	5
82b	S	S, N, T, G, H, D, R, A, K, I, M, V, F, E, P, Y, C, L	0,72	8
82c	L	L, V, M, P, A, T, G	0,08	2
83	Residuo distintivo: R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; más preferiblemente K		0,66	6

84	<u>Residuo distintivo:</u> P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P		0,85	7
85	E, G	E, D, G, A, Q, V, S, N, K, T, R, L	0,27	3
86	D	D, E, G, N	0,02	1
87	T, M	T, S, A, M, R, P, K, E	0,15	3

Tabla B-6: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR3 (continuación)

Pos.	Residuo (s) de aminoácido:		Ent. de V _{HH}	Var. de V _{HH}
	V _{H3} humano	V _{HH} de camélido		
88	A	A, G, S, D, N, T, P, V	0,23	2
89	V, L	V, <u>I</u> , L, E, A, R, T, D, F, M, N, S, K, G, Q, H	0,71	7
90	Y	Y, H, F, N	0	1
91	Y, H	Y, F, R, S, H, T, I, V, L, N, D, C, Q, W, A, E, M	0,6	7
92	C	C, R, P	0	1
93	A, K, T	A, <u>N</u> , <u>I</u> , K, G, V, R, Y, S, H, W, L, F, Q, M, I, E, C, D	1,33	10
94	K, R, T	A, <u>K</u> , <u>V</u> , <u>I</u> , R, L, G, S, D, Q, I, M, F, Y, N, E, H, P, C, W	1,55	12

- 5 Tabla B-7: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR4 (para las notas a pie de página, véanse las notas a pie de página en la tabla B-2)

Pos.	Residuo (s) de aminoácido:		Ent. de V _{HH}	Var. de V _{HH}
	V _{H3} humano	V _{HH} de camélido		
103	<u>Residuo distintivo:</u> W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; preferiblemente W		0,54	6
104	<u>Residuo distintivo:</u> G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G		0,13	3
105	Q, <u>R</u>	Q, <u>K</u> , H, R, P, E, L, T, N, S, V, A, M, G	0,52	5
106	G	G, R, E	0	1
107	T	T, Q, I, A, S, N, R, V, D	0,24	3
108	<u>Residuo distintivo:</u> Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L ⁽⁷⁾		0,3	4
109	V	V, I, L	0	1
110	T	T, S, N, A, I, F	0,01	1
111	V	V, I, A	0,01	1
112	S	S, T, P, F, A	0,01	1
113	S	S, T, A, L, P, F, E, V	0,04	1

- 10 Por tanto, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un Nanobody de la divulgación puede definirse como una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

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

i) uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2;

- 20 y en la que:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define

según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Los Nanobodies anteriores pueden, por ejemplo, ser secuencias de V_{HH} o pueden ser Nanobodies humanizados. Cuando las secuencias de Nanobody anteriores son secuencias de V_{HH} , pueden humanizarse adecuadamente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Cuando los Nanobodies son Nanobodies parcialmente humanizados, puede humanizarse opcionalmente de manera adecuada, de nuevo tal como se describe en el presente documento.

En particular, un Nanobody de la divulgación puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

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

i) (preferiblemente) uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2 (entendiéndose que las secuencias de V_{HH} contendrán uno o más residuos distintivos; y que los Nanobodies parcialmente humanizados contendrán habitualmente, y preferiblemente, [todavía] uno o más residuos distintivos [aunque está también dentro del alcance de la divulgación proporcionar, cuando sea adecuado según la divulgación, Nanobodies parcialmente humanizados en los que todos los residuos distintivos, pero no uno o más de los otros residuos de aminoácido, se han humanizado]; y que en Nanobodies totalmente humanizados, cuando sea adecuado según la divulgación, todos los residuos de aminoácido en las posiciones de los residuos distintivos serán residuos de aminoácido que se producen en una secuencia de V_{H3} humana. Tal como será evidente para el experto basándose en la divulgación en el presente documento que tales secuencias de V_{HH} , tales Nanobodies parcialmente humanizados con al menos un residuo distintivo, tales Nanobodies parcialmente humanizados sin residuos distintivos y tales Nanobodies totalmente humanizados forman todos los aspectos de esta divulgación);

y en la que:

ii) dicha secuencia de inmunoglobulina tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 1 a 22, en la que para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR (indicadas con X en las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 22) se descartan;

y en la que:

iii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Los Nanobodies anteriores puede, por ejemplo, ser secuencias de V_{HH} o pueden ser Nanobodies humanizados. Cuando las secuencias de Nanobody anteriores son secuencias de V_{HH} , pueden humanizarse adecuadamente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Cuando los Nanobodies son Nanobodies parcialmente humanizados, pueden opcionalmente humanizarse adicionalmente de manera adecuada, de nuevo tal como se describe en el presente documento.

Tabla B-8: Secuencias de inmunoglobulina representativas para Nanobodies del grupo KERE, GLEW y P,R,S 103. Las CDR están indicadas con XXXX.

Secuencia n.º 1 de KERE	SEQ ID NO: 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIPFSXXXXXWFRQAPGK QRDSVAXXXXXRFTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYRCYFX XXXXWGQGTQVTVSS
Secuencia n.º 2 de KERE	SEQ ID NO: 2	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVSGSRTFSXXXXXWFRLAPG KEREFVAXXXXXRFTISRDTASNRGYLHMNLTPEdTAVYYCAA XXXXWGQGTQVTVSS

Secuencia n.º 3 de KERE	SEQ ID NO: 3	AVQLVDSGGGLVQAGDSLKLSCALTGGAFTXXXXXWFRQTPG REREFVAXXXXRFTISRDNAMVYLRMNSLIPEDAAVYSCAA XXXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 4 de KERE	SEQ ID NO: 4	QVQLVESGGGLVEAGGSLRLSCTASESPFRXXXXXWFRQTSG QEREFVAXXXXRFTISRDDAKNTVWLHGSTLKPEDTAVYYCAA XXXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 5 de KERE	SEQ ID NO: 5	AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDXXXXXWYRQGGPG NERELVAXXXXRFTISMDYTKQTVYLHMNSLRPEDTGLYYCKI XXXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 6 de KERE	SEQ ID NO: 6	DVKFVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGFNFDXXXXXWFRQAPG KEREEVAXXXXRFTISSEKDKNSVYLQMNSLKPEDTALYICAG XXXXXWGRGTQTVTVSS
Secuencia n.º 7 de KERE	SEQ ID NO: 7	QVRLAESGGGLVQSGGSLRLSCVASGSTYTXXXXXWYRQYPG KQRALVAXXXXRFTIARDSTKDTFCLQMNNLKPEDTAVYYCYA XXXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 8 de KERE	SEQ ID NO: 8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTSDXXXXXWFRQAPG KPREGVSXXXRFTISTDNAKNTVHLLMNRVNAEDTALYICAV XXXXXWGRGTRTVTVSS
Secuencia n.º 9 de KERE	SEQ ID NO: 9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCQASGDISTXXXXXWYRQVPG KLREFVAXXXXRFTISGDNAKRAIYLMNNLKPDDTAVYYCNR XXXXXWGQGTQTVTVSP
Secuencia n.º 10 de KERE	SEQ ID NO: 10	QVPVESGGGLVQAGDSLRLFCVPSFTSTXXXXXWFRQAPGK EREFVAXXXXRFTISRNATKNTLTLRMDSLKPEDTAVYYCAAX XXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 11 de KERE	SEQ ID NO: 11	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLFCTVSGGTASXXXXXWFRQAPG EKREFVAXXXXRFTIARENAGNMVYLQMNNLKPDDTALYTCAA XXXXXWGRGTQTVTVSS
Secuencia n.º 12 de KERE	SEQ ID NO: 12	AVQLVESGGDSVQPGDSQTLSCAASGRTNSXXXXXWFRQAPG KERVFLAXXXXRFTISRDSAKNMMYLQMNNLKPQDTAVYYCA AXXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 13 de KERE	SEQ ID NO: 13	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVSGLTSSXXXXXWFRQTPW QERDFVAXXXXRFTISRDNKYKDTVLLEMNFLKPEDTAIYYCAAX XXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 14 de KERE	SEQ ID NO: 14	AVQLVESGGGLVQAGASLRLSCATSTRTLDDXXXXXWFRQAPGR DREFVAXXXXRFTVSRDSAENTVALQMNSLKPEDTAVYYCAA XXXXXWGQGTQTVTVSS
Secuencia n.º 15 de KERE	SEQ ID NO: 15	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSRLTAHXXXXXWFRQAPG KEREAVSXXXRFTISRDIYAGNTAFLQMDSLKPEDTGVYYCAT XXXXXWGQGTQTVTVSS

Secuencia n.º 16 de KERE	SEQ ID NO: 16	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRN FVXXXXWFRAPG KEREFVAXXXXXRFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCA VXXXXLGGGTQVTVSS
Secuencia n.º 1 de GLEW	SEQ ID NO: 17	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXXXXWVRQAPG KVLWVSXXXXXRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCVK XXXXXGSQGTQVTVSS
Secuencia n.º 2 de GLEW	SEQ ID NO: 18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCV CVSSGCTXXXXWVRQAPG KAEWVSXXXXXRFKISRDN AKKTLYLQMNSLGPEDTAMYQCQ RXXXXRGQGTQVTVSS
Secuencia n.º 3 de GLEW	SEQ ID NO: 19	EVQLVESGGGLALPGGSLT LSCVFSGSTFSXXXXWVRHTPGK AEEWVSXXXXXRFTISRDN AKNTLYLEMNSLSPEDTAMYCCGR XXXXXRSKGIQVTVSS
Secuencia n.º 1 de P, R, S 103	SEQ ID NO: 20	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSXXXXWFRQAPG KEREFVAXXXXXRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA XXXXXRGQGTQVTVSS
Secuencia n.º 2 de P, R, S 103	SEQ ID NO: 21	DVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFDXXXXWLRQTPG KGLEWVGXXXXXRFTISRDN AKNMLYLHLN NLKSEDTAVYYCR RXXXXLGGGTQVTVSS
Secuencia n.º 3 de P, R, S 103	SEQ ID NO: 22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCV CVSSGCTXXXXWVRQAPG KAEWVSXXXXXRFKISRDN AKKTLYLQMNSLGPEDTAMYQCQ RXXXXRGQGTQVTVSS

En particular, un Nanobody de la divulgación del grupo KERE puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

en la que:

10 i) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es un aminoácido cargado (tal como se define en el presente documento) o un residuo de cisteína, y la posición 44 es preferiblemente una E;

y en la que:

15 ii) FR1 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-9: secuencias representativas de FW1 para Nanobodies del grupo KERE.

Secuencia n.º 1 de FW1 de KERE	SEQ ID NO:23	QVQRVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSS
Secuencia n.º 2 de FW1 de KERE	SEQ ID NO:24	QVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCSASGRTFS
Secuencia n.º 3 de FW1 de KERE	SEQ ID NO:25	QVKLEESGGGLVQAGDSLRLSCAATGRAFG
Secuencia n.º 4 de FW1 de KERE	SEQ ID NO:26	AVQLVESGGGLVQPGESLGLSCVASGRDFV
Secuencia n.º 5 de FW1 de KERE	SEQ ID NO:27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEVLGRTAG

Secuencia n.º 6 de FW1 de KERE	SEQ NO:28	ID	QVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASETILS
Secuencia n.º 7 de FW1 de KERE	SEQ NO:29	ID	QVQLVESGGGTVQPGGSLNLSVASGNTFN
Secuencia n.º 8 de FW1 de KERE	SEQ NO:30	ID	EVQLVESGGGLAQPGGSLQLSCSAPGFTLD
Secuencia n.º 9 de FW1 de KERE	SEQ NO:31	ID	AQELEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFN

y en la que:

- 5 iii) FR2 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-10: secuencias representativas de FW2 para Nanobodies del grupo KERE.

Secuencia n.º 1 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 41	WFRQAPGKEREFVA
Secuencia n.º 2 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 42	WFRQTPGREREFVA
Secuencia n.º 3 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 43	WYRQAPGKQREMVA
Secuencia n.º 4 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 44	WYRQGPQKQRELVA
Secuencia n.º 5 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 45	WIRQAPGKEREGVS
Secuencia n.º 6 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 46	WFREAPGKEREGIS
Secuencia n.º 7 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 47	WYRQAPGKERDLVA
Secuencia n.º 8 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 48	WFRQAPGKQREEVS
Secuencia n.º 9 de FW2 de KERE	SEQ ID NO: 49	WFRQPPGKVREFVG

10 y en la que:

- iv) FR3 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

15 Tabla B-11: secuencias representativas de FW3 para nanobodies del grupo KERE.

Secuencia n.º 1 de FW3 de KERE	SEQ NO: 50	ID	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYRCYF
Secuencia n.º 2 de FW3 de KERE	SEQ NO: 51	ID	RFAISRDNKNTGYLQMNSLEPEDTAVYYCAA
Secuencia n.º 3 de FW3 de KERE	SEQ NO: 52	ID	RFTVARNNKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAA
Secuencia n.º 4 de FW3 de KERE	SEQ NO: 53	ID	RFTISRDIKNTVDLLMNNLEPEDTAVYYCAA
Secuencia n.º 5 de FW3 de KERE	SEQ NO: 54	ID	RLTISRDNVDTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
Secuencia n.º 6 de FW3 de KERE	SEQ NO: 55	ID	RFTISRDNKNTVYLQMDNVKPEDTAIYYCAA
Secuencia n.º 7 de FW3 de KERE	SEQ NO: 56	ID	RFTISKDSGKNTVYLQMTSLKPEDTAVYYCAT

FW3 de KERE	NO: 56	
Secuencia n.º 8 de FW3 de KERE	SEQ ID NO: 57	RFTISRDSAKNMMYLQMNNLKPQDTAVYYCAA
Secuencia n.º 9 de FW3 de KERE	SEQ ID NO: 58	RFTISRENDKSTVYLQLNSLKPEDTAVYYCAA
Secuencia n.º 10 de FW3 de KERE	SEQ ID NO: 59	RFTISRDIYAGNTAYLQMNSLKPEDTGVYYCAT

y en la que:

v) FR4 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-12: secuencias representativas de FW4 para Nanobodies del grupo KERE.

Secuencia n.º 1 de FW4 de KERE	SEQ ID NO: 60	WGQGTQVTSS
Secuencia n.º 2 de FW4 de KERE	SEQ ID NO: 61	WGKGLTVTSS
Secuencia n.º 3 de FW4 de KERE	SEQ ID NO: 62	RGQGTRVTSS
Secuencia n.º 4 de FW4 de KERE	SEQ ID NO: 63	WGLGTQVTSS

y en la que:

vi) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

En los Nanobodies anteriores, uno o más de los residuos distintivos adicionales son preferiblemente tal como se describen en el presente documento (por ejemplo, cuando son secuencias de V_{HH} o Nanobodies parcialmente humanizados).

Además, los Nanobodies anteriores pueden, por ejemplo, ser secuencias de V_{HH} o pueden ser Nanobodies humanizados. Cuando las secuencias de Nanobody anteriores son secuencias de V_{HH} , pueden humanizarse adecuadamente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Cuando los Nanobodies son Nanobodies parcialmente humanizados, pueden humanizarse opcionalmente además de manera adecuada, de nuevo tal como se describe en el presente documento.

Con respecto a la región de entramado 1, resultará evidente para el experto que, cuando una secuencia de inmunoglobulina tal como se señala anteriormente se genera mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos, las primeras cuatro secuencias de inmunoglobulina (es decir, residuos de aminoácido 1-4 según la numeración de Kabat) pueden determinarse a menudo por el/los cebador(es) que se han usado para generar dicho ácido nucleico. Por tanto, para determinar el grado de identidad de aminoácidos, los primeros cuatro residuos de aminoácido se descartan preferiblemente.

Además, con respecto a la región de entramado 1, y aunque las posiciones de aminoácido 27 a 30 se consideran según la numeración de Kabat parte de las regiones de entramado (y no las CDR), se ha encontrado mediante análisis de una base de datos de más de 1000 secuencias de V_{HH} que las posiciones 27 a 30 tienen una variabilidad (expresada en cuanto a entropía de V_{HH} y variabilidad de V_{HH} , véanse las tablas B-4 a B-7) que es mucho mayor que la variabilidad en las posiciones 1 a 26. Debido a esto, para determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido en las posiciones 27 a 30 se descartan también preferiblemente.

En vista de esto, un Nanobody de la clase KERE puede ser una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en la que:

i) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es un aminoácido cargado (tal como se define en el presente documento) o un residuo de cisteína, y la posición 44 es preferiblemente una E;

y en la que:

ii) FR1 es una secuencia de inmunoglobulina que, en las posiciones 5 a 26 de la numeración de Kabat, tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-13: Secuencias de FW1 representativas (residuos de aminoácido 5 a 26) para Nanobodies del grupo KERE.

Secuencia n.º 10 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 32	VESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
Secuencia n.º 11 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 33	VDSGGGLVQAGDSLKLSCALTG
Secuencia n.º 12 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 34	VDSGGGLVQAGDSLRLSCAASG
Secuencia n.º 13 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 35	VDSGGGLVEAGGSLRLSCQVSE
Secuencia n.º 14 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 36	QDSGGGSVQAGGSLKLSCAASG
Secuencia n.º 15 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 37	VQSGGRLVQAGDSLRLSCAASE
Secuencia n.º 16 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 38	VESGGTLVQSGDSLKLSCASST
Secuencia n.º 17 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 39	MESGGDSVQSGGSLTLSCVASG
Secuencia n.º 18 de FW1 de KERE	SEQ ID NO: 40	QASGGGLVQAGGSLRLSCSASV

y en la que:

iii) FR2, FR3 y FR4 son tal como se menciona en el presente documento para FR2, FR3 y FR4 de Nanobodies de la clase KERE;

y en la que:

iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Los Nanobodies anteriores pueden, por ejemplo, ser secuencias de V_{HH} o pueden ser Nanobodies humanizados. Cuando las secuencias de Nanobody anteriores son secuencias de V_{HH} , pueden humanizarse adecuadamente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Cuando los Nanobodies son Nanobodies parcialmente humanizados, pueden humanizarse opcionalmente además de manera adecuada, de nuevo tal como se describe en el presente documento.

Un Nanobody de la clase GLEW puede ser una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en la que

i) preferiblemente, cuando el Nanobody de la clase GLEW es un Nanobody no humanizado, el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

ii) FR1 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-14: Secuencias de FW1 representativas para Nanobodies del grupo GLEW.

Secuencia n.º1 de FW1 de GLEW	SEQ ID NO: 64	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
Secuencia n.º1 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 65	EVHLVESGGGLVRPGGSLRLSCAAFGFIFK

Secuencia n.º 3 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 66	QVKLEESGGGLAQPGGSLRLSCVASGFTFS
Secuencia n.º 4 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCVSSGCT
Secuencia n.º 5 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO :68	EVQLVESGGGLALPGGSLTLSCVFSGSTFS

y en la que:

- 5 iii) FR2 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-15: Secuencias de FW2 representativas para Nanobodies del grupo GLEW.

Secuencia n.º 1 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 72	WVRQAPGKVLEWVS
Secuencia n.º 2 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 73	WVRRPPGKGLEWVS
Secuencia n.º 3 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 74	WVRQAPGMGLEWVS
Secuencia n.º 4 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 75	WVRQAPGKEPEWVS
Secuencia n.º 5 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 76	WVRQAPGKDQEWVS
Secuencia n.º 6 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 77	WVRQAPGKAEWVS
Secuencia n.º 7 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 78	WVRQAPGKGLEWVA
Secuencia n.º 8 de FW2 de GLEW	SEQ ID NO: 79	WVRQAPGRATEWVS

- 10 y en la que:

iv) FR3 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

- 15 Tabla B-16: Secuencias de FW3 representativas para Nanobodies del grupo GLEW.

Secuencia n.º 1 de FW3 de GLEW	SEQ ID NO: 80	RFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCVK
Secuencia n.º 2 de FW3 de GLEW	SEQ ID NO: 81	RFTISRDNARNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR
Secuencia n.º 3 de FW3 de GLEW	SEQ ID NO: 82	RFTSSRDNAKSTLYLQMNDLKPEDTALYYCAR
Secuencia n.º 4 de FW3 de GLEW	SEQ ID NO: 83	RFIISRDNKNTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQR
Secuencia n.º 5 de FW3 de GLEW	SEQ ID NO: 84	RFTASRDNAKNTLYLQMNSLKSSEDATARYYCAR
Secuencia n.º 6 de FW3 de GLEW	SEQ ID NO: 85	RFTISRDNKNTLYLQMDDLQSEDATAMYYCGR

y en la que:

- 20 v) FR4 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-17: Secuencias de FW4 representativas para Nanobodies del grupo GLEW.

Secuencia n.º 1 de FW4 de GLEW	SEQ ID NO: 86	GSQGTQVTSS
Secuencia n.º 2 de FW4 de GLEW	SEQ ID NO: 87	LRGGTQVTSS
Secuencia n.º 3 de FW4 de GLEW	SEQ ID NO: 88	RGQGTQVTSS
Secuencia n.º 4 de FW4 de GLEW	SEQ ID NO: 89	RSRGIQVTSS
Secuencia n.º 5 de FW4 de GLEW	SEQ ID NO: 90	WGKGTQVTSS
Secuencia n.º 6 de FW4 de GLEW	SEQ ID NO: 91	WGQGTQVTSS

y en la que:

5 vi) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

10 En los Nanobodies anteriores, uno o más de los residuos distintivos adicionales son preferiblemente tal como se describen en el presente documento (por ejemplo, cuando son secuencias de V_{HH} o Nanobodies parcialmente humanizados).

15 Con respecto a la región de entramado 1, será de nuevo evidente para el experto que, para determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido en las posiciones 1 a 4 y 27 a 30 se descartan preferiblemente.

20 En vista de esto, un Nanobody de la clase GLEW puede ser una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en la que:

i) preferiblemente, cuando el Nanobody de la clase GLEW es un Nanobody no humanizado, el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

25 y en la que:

ii) FR1 es una secuencia de inmunoglobulina que, en las posiciones 5 a 26 de la numeración de Kabat, tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

30 Tabla B-18: Secuencias de FW1 representativas (residuos de aminoácido 5 a 26) para Nanobodies del grupo KERE.

Secuencia n.º 6 de FW1 de GLEW	SEQ ID NO: 69	VESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
Secuencia n.º 7 de FW1 de GLEW	SEQ ID NO: 70	EESGGGLAQPGGSLRLSCVASG
Secuencia n.º 8 de FW1 de GLEW	SEQ ID NO: 71	VESGGGLALPGGSLTLSCVFSG

y en la que:

35 iii) FR2, FR3 y FR4 son tal como se menciona en el presente documento para FR2, FR3 y FR4 de Nanobodies de la clase GLEW;

y en la que:

40 iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

Los Nanobodies anteriores pueden, por ejemplo, ser secuencias de V_{HH} o pueden ser Nanobodies humanizados. Cuando las secuencias de Nanobody anteriores son secuencias de V_{HH} , pueden humanizarse adecuadamente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Cuando los Nanobodies son Nanobodies parcialmente humanizados, pueden humanizarse opcionalmente además de manera adecuada, de nuevo tal como se describe en el presente documento. En los Nanobodies anteriores, uno o más de los residuos distintivos adicionales son preferiblemente tal como se describen en el presente documento (por ejemplo, cuando son secuencias de V_{HH} o Nanobodies parcialmente humanizados).

Un Nanobody de la clase P, R, S 103 puede ser una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en la que

i) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat es diferente de W;

y en la que:

ii) preferiblemente el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat es P, R o S, y más preferiblemente R;

y en la que:

iii) FR1 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-19: Secuencias de FW1 representativas para Nanobodies del grupo P,R,S 103.

Secuencia n.º 1 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 92	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS
Secuencia n.º 2 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 93	QVQLQESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFDFG
Secuencia n.º 3 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 94	EVHLVESGGGLVRPGGSLRLSCAAFGFIFK
Secuencia n.º 4 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 95	QVQLAESGGGLVQPGGSLKLSCAASRTIVS
Secuencia n.º 5 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 96	QEHLVESGGGLVDIGGSLRLSCAASERIFS
Secuencia n.º 6 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 97	QVKLEESGGGLAQPGGSLRLSCVASGFTFS
Secuencia n.º 7 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSVSSGCT
Secuencia n.º 8 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 99	EVQLVESGGGLALPGGSLTLSCVFSGSTFS

y en la que

iv) FR2 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-20: Secuencias de FW2 representativas para Nanobodies del grupo P,R,S 103.

Secuencia n.º 1 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 102	WFRQAPGKEREFA
Secuencia n.º 2 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 103	WVRQAPGKVLWVS
Secuencia n.º 3 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 104	WVRRPPGKGLEWVS
Secuencia n.º 4 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 105	WIRQAPGKEREGVS

Secuencia n.º 5 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 106	WVRQYPGKEPEWVS
Secuencia n.º 6 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 107	WFRQPPGKEHEFVA
Secuencia n.º 7 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO :108	WYRQAPGKRTELVA
Secuencia n.º 8 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 109	WLRQAPGQGLEWVS
Secuencia n.º 9 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 110	WLRQTPGKGLEWVG
Secuencia n.º 10 de FW2 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 111	WVRQAPGKAEEFVS

y en la que:

- 5 v) FR3 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

Tabla B-21: Secuencias de FW3 representativas para Nanobodies del grupo P,R,S 103.

Secuencia n.º 1 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 112	RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
Secuencia n.º 2 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 113	RFTISRDNARNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR
Secuencia n.º 3 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 114	RFTISRDNAKNEMYLQMNNLKTEDTGVYWCGA
Secuencia n.º 4 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO:115	RFTISSDSNRNMIYLMNNLKPEDTAVYYCAA
Secuencia n.º 5 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO:116	RFTISRDNAKNMLYLHLNNLKS EDTAVYYCRR
Secuencia n.º 6 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO:117	RFTISRDNAKKTVYLRNLNLPEDTAVYSCNL
Secuencia n.º 7 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO:118	RFKISRDNAKKTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQR
Secuencia n.º 8 de FW3 de P,R,S 103	SEQ ID NO:119	RFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCAV

10 y en la que:

- vi) FR4 es una secuencia de inmunoglobulina que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

15 Tabla B-22: Secuencias de FW4 representativas para Nanobodies del grupo P,R,S 103.

Secuencia n.º 1 de FW4 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 120	RGQGTQVTVSS
Secuencia n.º 2 de FW4 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 121	LRGGTQVTVSS
Secuencia n.º 3 de FW4 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 122	GNKGTQVTVSS
Secuencia n.º 4 de FW4 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 123	SSPGTQVTVSS
Secuencia n.º 5 de FW4 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 124	SSQGTQVTVSS
Secuencia n.º 6 de FW4	SEQ ID NO: 125	RSRGIQVTVSS

de P,R,S 103		
--------------	--	--

y en la que:

- 5 vii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

10 En los Nanobodies anteriores, uno o más de los residuos distintivos adicionales son preferiblemente tal como se describen en el presente documento (por ejemplo, cuando son secuencias de V_{HH} o Nanobodies parcialmente humanizados).

15 Con respecto a la región de entramado 1, será de nuevo evidente para el experto que, para determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido en las posiciones 1 a 4 y 27 a 30 se descartan preferiblemente. En vista de esto, un Nanobody de la clase P,R,S 103 puede ser una secuencia de inmunoglobulina que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, en la que:

i) el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat es diferente de W;

20 y en la que:

ii) preferiblemente el residuo de aminoácido en la posición 103 según la numeración de Kabat es P, R o S, y más preferiblemente R;

25 y en la que:

iii) FR1 es una secuencia de inmunoglobulina que, en las posiciones 5 a 26 de la numeración de Kabat, tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las siguientes secuencias de inmunoglobulina:

30 Tabla B-23: Secuencias de FW1 representativas (residuos de aminoácido 5 a 26) para Nanobodies del grupo P,R,S 103.

Secuencia n.º 9 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 100	VESGGGLVQAGGSLRLSCAASG
Secuencia n.º 10 de FW1 de P,R,S 103	SEQ ID NO: 101	AESGGGLVQPGGSLKLSAASR

y en la que:

35 iv) FR2, FR3 y FR4 son tal como se menciona en el presente documento para FR2, FR3 y FR4 de Nanobodies de la clase P,R,S 103;

y en la que:

40 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se define en el presente documento, y son preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos preferidos en el presente documento, y son más preferiblemente tal como se define según uno de los aspectos más preferidos en el presente documento.

45 Los Nanobodies anteriores pueden, por ejemplo, ser secuencias de V_{HH} o pueden ser Nanobodies humanizados. Cuando las secuencias de Nanobody anteriores son secuencias de V_{HH} , pueden humanizarse adecuadamente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Cuando los Nanobodies son Nanobodies parcialmente humanizados, pueden humanizarse opcionalmente además de manera adecuada, de nuevo tal como se describe en el presente documento.

50 En los Nanobodies anteriores, uno o más de los residuos distintivos adicionales son preferiblemente tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, cuando son secuencias de V_{HH} o Nanobodies parcialmente humanizados).

55 En otro aspecto preferido, pero no limitativo, la divulgación se refiere a un Nanobody tal como se describe anteriormente, en el que las secuencias de CDR tienen al menos una identidad de aminoácidos del 70%, preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 80%, más preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 90%, tal como una identidad de aminoácidos del 95% o más o incluso esencialmente una identidad de aminoácidos del 100% con las secuencias de CDR de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de

SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1). Este grado de identidad de aminoácidos puede, por ejemplo, determinarse determinando el grado de identidad de aminoácidos (de una manera descrita en el presente documento) entre dicho Nanobody y una o más de las secuencias de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1), en el que los residuos de aminoácido que forman las regiones de entramado se descartan. Tales Nanobodies pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Tal como ya se menciona en el presente documento, otro aspecto preferido pero no limitativo de la divulgación se refiere a un Nanobody con una secuencia de inmunoglobulina que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1) o del grupo que consiste en secuencias de inmunoglobulina que tienen más del 80%, preferiblemente más del 90%, más preferiblemente más del 95%, tal como el 99% o más de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1).

Además, en los Nanobodies anteriores:

i) cualquier sustitución de aminoácido (cuando no es una sustitución humanizante tal como se define en el presente documento) es preferiblemente, y en comparación con la correspondiente secuencia de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1), una sustitución de aminoácido conservadora, (tal como se define en el presente documento);

y/o:

ii) su secuencia de inmunoglobulina contiene preferiblemente o bien sólo sustituciones de aminoácido, o bien de otro modo preferiblemente no más de 5, preferiblemente no más de 3, y más preferiblemente sólo 1 ó 2 deleciones o inserciones de aminoácido, en comparación con la correspondiente secuencia de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1);

y/o

iii) las CDR pueden ser CDR que derivan por medio de maduración de afinidad, por ejemplo, a partir de las CDR de la correspondiente secuencia de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1).

Preferiblemente, las secuencias de CDR y secuencias de FR en los Nanobodies de la divulgación son tales que los Nanobodies de la divulgación (y polipéptidos de la divulgación que comprenden los mismos):

- se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 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} litro/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litro/moles);

y/o tales que:

- se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad k_{on} de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y 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 tales que:

- se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad k_{off} entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0,69$ s) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ 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} .

Preferiblemente, las secuencias de CDR y secuencias de FR presentes en los Nanobodies de la divulgación son tales que los Nanobodies de la divulgación se unirán a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 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.

Según un aspecto no limitativo de la divulgación, un Nanobody puede ser tal como se define en el presente

documento, pero con la condición de que tenga al menos “una diferencia de aminoácido” (tal como se define en el presente documento) en al menos una de las regiones de entramado en comparación con la correspondiente región de entramado de un dominio de V_H que se produce de manera natural, y en particular en comparación con la correspondiente región de entramado de DP-47. Más específicamente, según un aspecto no limitativo de la divulgación, un Nanobody puede ser tal como se define en el presente documento, pero con la condición de que tenga al menos “una diferencia de aminoácido” (tal como se define en el presente documento) en al menos uno de los residuos distintivos (incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45) en comparación con la correspondiente región de entramado de un dominio de V_H que se produce de manera natural, y en particular en comparación con la correspondiente región de entramado de DP-47. Habitualmente, un Nanobody tendrá al menos una diferencia de aminoácido de este tipo con un dominio de V_H que se produce de manera natural en al menos uno de FR2 y/o FR4, y en particular en al menos uno de los residuos distintivos en FR2 y/o FR4 (de nuevo, incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45).

Además, un Nanobody humanizado de la divulgación puede ser tal como se define en el presente documento, pero con la condición de que tenga al menos “una diferencia de aminoácido” (tal como se define en el presente documento) en al menos una de las regiones de entramado en comparación con la correspondiente región de entramado de un dominio de V_{HH} que se produce de manera natural. Más específicamente, según un aspecto no limitativo de la divulgación, un Nanobody humanizado puede ser tal como se define en el presente documento, pero con la condición de que tenga al menos “una diferencia de aminoácido” (tal como se define en el presente documento) en al menos uno de los residuos distintivos (incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45) en comparación con la correspondiente región de entramado de un dominio de V_{HH} que se produce de manera natural. Habitualmente, un Nanobody humanizado tendrá al menos una diferencia de aminoácido de este tipo con un dominio de V_{HH} que se produce de manera natural en al menos uno de FR2 y/o FR4, y en particular en al menos uno de los residuos distintivos en FR2 y/o FR4 (de nuevo, incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45).

Tal como será evidente a partir de la divulgación en el presente documento, también está dentro del alcance de la divulgación usar análogos, mutantes, variantes, alelos, homólogos y ortólogos naturales o sintéticos (en el presente documento denominados en conjunto “análogos”) de los Nanobodies de la divulgación tal como se define en el presente documento, y en particular análogos de los Nanobodies de SEQ ID NO 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1). Por tanto, según un aspecto de la divulgación, el término “Nanobody de la divulgación” en su sentido más amplio también cubre tales análogos.

Generalmente, en tales análogos, uno o más residuos de aminoácido pueden haberse reemplazado, delecionado y/o añadido, en comparación con los Nanobodies de la divulgación tal como se define en el presente documento. Tales sustituciones, inserciones o deleciones pueden realizarse en una o más de las regiones de entramado y/o en una o más de las CDR. Cuando tales sustituciones, inserciones o deleciones se realizan en una o más de las regiones de entramado, pueden realizarse en uno o más de los residuos distintivos y/o en una o más de las otras posiciones en los residuos de región de entramado, aunque sustituciones, inserciones o deleciones en los residuos distintivos son generalmente menos preferidas (a menos que sean sustituciones humanizantes adecuadas tal como se describe en el presente documento).

Por medio de ejemplos no limitativos, una sustitución puede, por ejemplo, ser una sustitución conservadora (tal como se describe en el presente documento) y/o un residuo de aminoácido puede reemplazarse por otro residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la misma posición en otro dominio de V_{HH} (véanse las tablas B-4 a B-7 para algunos ejemplos no limitativos de tales sustituciones), aunque la divulgación no se limita generalmente a los mismos. Por tanto, una cualquiera o más sustituciones, deleciones o inserciones, o cualquier combinación de los mismos, que o bien mejoran las propiedades del Nanobody de la divulgación o bien que al menos no limitan demasiado las propiedades deseadas o el equilibrio o combinación de propiedades deseadas del Nanobody de la divulgación (es decir, hasta el grado que el Nanobody ya no es adecuado para su uso previsto) se incluyen dentro del alcance de la divulgación. Un experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones, deleciones o inserciones adecuadas, o combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede, por ejemplo, implicar introducir un número limitado de posibles sustituciones y determinar su influencia en las propiedades de los Nanobodies así obtenidos.

Por ejemplo, y según el organismo huésped usado para expresar el Nanobody o polipéptido de la divulgación, tales deleciones y/o sustituciones pueden diseñarse de modo tal que uno o más sitios para la modificación postraducciona (tal como uno o más sitios de glicosilación) se retiren, tal como estará dentro de la capacidad del experto en la técnica. Alternativamente, pueden diseñarse sustituciones o inserciones para introducir uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (tal como se describe en el presente documento), por ejemplo, para permitir pegilación específica del sitio (de nuevo tal como se describe en el presente documento).

Tal como puede observarse a partir de los datos en la entropía de V_{HH} y variabilidad de V_{HH} dados en las tablas B-4 a B-7 anteriores, algunos residuos de aminoácido en las regiones de entramado están más conservados que otros. Generalmente, aunque la divulgación en su sentido más amplio no se limita a las mismas, cualquier sustitución,

delección o inserción se realiza preferiblemente en las posiciones que están menos conservadas. Además, generalmente, se prefieren sustituciones de aminoácido por encima de delecciones o inserciones de aminoácido.

Los análogos son preferiblemente tales que pueden unirse a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afinidad (medida y/o expresada adecuadamente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off} , o alternativamente como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento para los Nanobodies de la divulgación.

Los análogos son preferiblemente también tales que mantienen las propiedades favorables los Nanobodies, tal como se describe en el presente documento.

Además, según un aspecto preferido, los análogos tienen un grado de identidad de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, tal como al menos el 95% o el 99% o más; y/o preferiblemente tienen como mucho 20, preferiblemente como mucho 10, incluso más preferiblemente como mucho 5, tal como 4, 3, 2 o sólo 1 diferencia de aminoácido (tal como se define en el presente documento), con uno de los Nanobodies de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1).

Además, las secuencias de región de entramado y CDR de los análogos son preferiblemente tales que están conformes con los aspectos preferidos definidos en el presente documento. Más generalmente, tal como se describe en el presente documento, los análogos tendrán (a) una Q en la posición 108; y/o (b) un aminoácido cargado o un residuo de cisteína en la posición 45 y preferiblemente una E en la posición 44, y más preferiblemente E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103.

Una clase preferida de análogos de los Nanobodies de la divulgación comprende Nanobodies que se han humanizado (es decir, en comparación con la secuencia de un Nanobody que se produce de manera natural de la divulgación). Tal como se menciona en la técnica anterior citada en el presente documento, tal humanización implica generalmente reemplazar uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de una V_{HH} que se produce de manera natural con los residuos de aminoácido que se producen en la misma posición en un dominio de V_H humano, tal como un dominio de V_{H3} humano. Ejemplos de posibles sustituciones humanizantes o combinaciones de sustituciones humanizantes serán evidentes para el experto, por ejemplo, a partir de las tablas en el presente documento, a partir de las posibles sustituciones humanizantes mencionadas en la técnica anterior citada en el presente documento, y/o a partir de una comparación entre la secuencia de un Nanobody y la secuencia de un dominio de V_H que se produce de manera natural.

Las sustituciones humanizantes deben elegirse de modo que los Nanobodies humanizados resultantes todavía mantengan las propiedades favorables de Nanobodies tal como se define en el presente documento, y más preferiblemente de modo que sean tal como se describe para los análogos en los párrafos precedentes. Un experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones humanizantes adecuadas o combinaciones adecuadas de sustituciones humanizantes, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede, por ejemplo, implicar introducir un número limitado de posibles sustituciones humanizantes y determinar su influencia sobre las propiedades de los Nanobodies así obtenidos.

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

Los Nanobodies de la divulgación pueden humanizarse adecuadamente en cualquier residuo de región de entramado, tal como en uno o más residuos distintivos (tal como se define en el presente documento) o en uno o más de otros residuos de región de entramado (es decir, residuos no distintivos) o cualquier combinación adecuada de los mismos. Una sustitución humanizante preferida para Nanobodies del “grupo P,R,S-103” o el “grupo KERE” es Q108 en L108. También pueden humanizarse Nanobodies de la “clase GLEW” mediante una sustitución de Q108 en L108, siempre que al menos uno de los otros residuos distintivos contenga una sustitución de camélido (camelizante) (tal como se define en el presente documento). Por ejemplo, tal como se menciona anteriormente, una clase particularmente preferida de Nanobodies humanizados tiene GLEW o una secuencia tipo GLEW en las posiciones 44-47; P, R o S (y en particular R) en la posición 103, y una L en la posición 108.

Los análogos humanizados y otros análogos, y secuencias de ácido nucleico que codifican para los mismos, pueden

proporcionarse de cualquier manera conocida *per se*, por ejemplo, usando una o más de las técnicas mencionadas en las páginas 103 y 104 del documento WO 08/020079.

Tal como se menciona en el mismo, también será evidente para el experto que los Nanobodies de la divulgación (incluyendo sus análogos) pueden diseñarse y/o prepararse a partir de secuencias de V_H humanas (es decir secuencias de inmunoglobulina o las correspondientes secuencias de nucleótidos), tal como por ejemplo a partir de secuencias de V_H3 humanas tales como DP-47, DP-51 o DP-29, es decir introduciendo una o más sustituciones camelizantes (es decir, cambiando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de inmunoglobulina de dicho dominio de V_H humano en los residuos de aminoácido que se producen en la correspondiente posición en un dominio de V_{HH}), para proporcionar la secuencia de un Nanobody de la divulgación y/o para conferir las propiedades favorables de un Nanobody a la secuencia así obtenida. De nuevo, esto puede realizarse generalmente usando los diversos métodos y técnicas a los que se hace referencia en el párrafo anterior, usando una secuencia de inmunoglobulina y/o secuencia de nucleótidos para un dominio de V_H humano como punto de partida.

Algunas sustituciones camelizantes preferidas, pero no limitativas, pueden derivarse de las tablas B-4 - B-7. También será evidente que sustituciones camelizantes en uno o más de los residuos distintivos tendrán generalmente una mayor influencia sobre las propiedades deseadas que sustituciones en una o más de las otras posiciones de aminoácido, aunque ambas y cualquier combinación adecuada de las mismas se incluyen dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, es posible introducir una o más sustituciones camelizantes que ya confieren al menos algunas de las propiedades deseadas, y luego introducir sustituciones camelizantes adicionales que o bien mejoran dichas propiedades y/o bien confieren propiedades favorables adicionales. De nuevo, el experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones camelizantes adecuadas o combinaciones adecuadas de sustituciones camelizantes, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación de rutina, que puede, por ejemplo, implicar introducir un número limitado de posibles sustituciones camelizantes y determinar si las propiedades favorables de Nanobodies se obtienen o mejoran (es decir, en comparación con el dominio de V_H original).

Generalmente, sin embargo, tales sustituciones camelizantes son preferiblemente tales que la secuencia de inmunoglobulina resultante al menos contiene (a) una Q en la posición 108; y/o (b) un aminoácido cargado o un residuo de cisteína en la posición 45 y preferiblemente también una E en la posición 44, y más preferiblemente E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103; y opcionalmente una o más sustituciones camelizantes adicionales. Más preferiblemente, las sustituciones camelizantes son tales que dan como resultado un Nanobody de la divulgación y/o un análogo del mismo (tal como se define en el presente documento), tal como un análogo humanizado y/o preferiblemente un análogo que es tal como se define en los párrafos precedentes.

También pueden derivarse Nanobodies de dominios de V_H mediante la incorporación de sustituciones que son raras en la naturaleza pero, no obstante, compatibles a nivel estructural con el pliegue del dominio de V_H. Por ejemplo, pero sin ser limitativo, estas sustituciones pueden incluir uno o más de lo siguiente: Gly en la posición 35, Ser, Val o Thr en la posición 37, Ser, Thr, Arg, Lys, His, Asp o Glu en la posición 39, Glu o His en la posición 45, Trp, Leu, Val, Ala, Thr o Glu en la posición 47, S o R en la posición 50. (Barthelemy *et al.* J Biol Chem. 8 de febrero de 2008;283(6):3639-54. Epub, 28 de noviembre de 2007).

Tal como será evidente a partir de la divulgación en el presente documento, también está dentro del alcance de la divulgación usar partes o fragmentos, o combinaciones de dos o más partes o fragmentos, de los Nanobodies de la divulgación tal como se define en el presente documento, y en particular partes o fragmentos de los Nanobodies de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1). Por tanto, según un aspecto de la divulgación, el término "Nanobody de la divulgación" en su sentido más amplio también cubre tales partes o fragmentos.

Generalmente, tales partes o fragmentos de los Nanobodies de la divulgación (incluyendo análogos de los mismos) tienen secuencias de inmunoglobulina en las que, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina del Nanobody de longitud completa correspondiente de la divulgación (o análogo del mismo), uno o más de los residuos de aminoácido en el extremo N-terminal, uno o más residuos de aminoácido en el extremo C-terminal, uno o más residuos de aminoácido internos contiguos, o cualquier combinación de los mismos, se han delecionado y/o eliminado.

Las partes o fragmentos son preferiblemente tales que pueden unirse a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afinidad (medida y/o expresada adecuadamente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off}, o alternativamente como un valor de CI₅₀, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento para los Nanobodies de la divulgación.

Cualquier parte o fragmento es preferiblemente tal que comprende al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, más preferiblemente al menos 30 residuos de aminoácido contiguos, tales como al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, de la secuencia de inmunoglobulina del Nanobody de longitud completa correspondiente de la divulgación.

Además, cualquier parte o fragmento es tal que comprende preferiblemente al menos una de CDR1, CDR2 y/o CDR3 o al menos parte de las mismas (y en particular al menos CDR3 o al menos parte de la misma). Más preferiblemente, cualquier parte o fragmento es tal que comprende al menos una de las CDR (y preferiblemente al menos CDR3 o parte de la misma) y al menos otra CDR (es decir CDR1 o CDR2) o al menos parte de la misma, preferiblemente conectadas mediante secuencia(s) de región de entramado adecuada(s) o al menos parte de la(s) misma(s). Más preferiblemente, cualquier parte o fragmento es tal que comprende al menos una de las CDR (y preferiblemente al menos CDR3 o parte de la misma) y al menos parte de las dos CDR restantes, de nuevo preferiblemente conectadas mediante secuencia(s) de región de entramado adecuada(s) o al menos parte de la(s) misma(s).

Según otro aspecto particularmente preferido, pero no limitativo, una parte o fragmento de este tipo comprende al menos CDR3, tal como FR3, CDR3 y FR4 del Nanobody de longitud completa correspondiente de la divulgación, es decir tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 03/050531 (Lasters *et al.*).

Tal como ya se mencionó anteriormente, también es posible combinar dos o más de tales partes o fragmentos (es decir, de los mismos o diferentes Nanobodies de la divulgación), es decir para proporcionar un análogo (tal como se define en el presente documento) y/o para proporcionar partes o fragmentos adicionales (tal como se define en el presente documento) de un Nanobody de la divulgación. Por ejemplo, también es posible combinar una o más partes o fragmentos de un Nanobody de la divulgación con una o más partes o fragmentos de un dominio de V_H humano.

Según un aspecto preferido, las partes o fragmentos tienen un grado de identidad de secuencia de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente al menos el 80%, tal como al menos el 90%, el 95% o el 99% o más con uno de los Nanobodies de SEQ ID NO 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778 (véase la tabla A-1).

Las partes y fragmentos, y secuencias de ácido nucleico que codifican para el mismo, pueden proporcionarse y opcionalmente combinarse de cualquier manera conocida *per se*. Por ejemplo, tales partes o fragmentos pueden obtenerse insertando un codón de terminación en un ácido nucleico que codifica para un Nanobody de tamaño completo de la divulgación y después expresando el ácido nucleico así obtenido de manera conocida *per se* (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento).

Alternativamente, pueden obtenerse ácidos nucleicos que codifican para tales partes o fragmentos restringiendo de manera adecuada un ácido nucleico que codifica para un Nanobody de tamaño completo de la divulgación o sintetizando un ácido nucleico de este tipo de manera conocida *per se*. También pueden proporcionarse partes o fragmentos usando técnicas para síntesis de péptidos conocidas *per se*.

La divulgación en su sentido más amplio también comprende derivados de los Nanobodies de la divulgación. Tales derivados pueden obtenerse generalmente mediante modificación, y en particular mediante modificación química y/o biológica (por ejemplo, enzimática), de los Nanobodies de la divulgación y/o de uno o más de los residuos de aminoácido que forman los Nanobodies de la divulgación.

Ejemplos de tales modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácido dentro de la secuencia de Nanobody que pueden modificarse de tal manera (es decir, o bien en la estructura principal de proteína o bien preferiblemente en una cadena lateral), métodos y técnicas que pueden usarse para introducir tales modificaciones y los posibles usos y ventajas de tales modificaciones serán evidentes para el experto.

Por ejemplo, una modificación de este tipo puede implicar la introducción (por ejemplo, mediante unión covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, residuos o restos en o sobre el Nanobody de la divulgación, y en particular de uno o más grupos funcionales, residuos o restos que confieren una o más propiedades deseadas o funcionalidades al Nanobody de la divulgación. Un ejemplo de tales grupos funcionales será evidente para el experto.

Por ejemplo, tal modificación puede comprender la introducción (por ejemplo, mediante unión covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales que aumentan la semivida, la solubilidad y/o la absorción del Nanobody de la divulgación, que reducen la inmunogenicidad y/o la toxicidad del Nanobody de la divulgación, que eliminan o atenúan cualquier efecto secundario indeseable del Nanobody de la divulgación, y/o que confieren otras propiedades ventajosas a y/o reducen las propiedades no deseadas de los Nanobodies y/o polipéptidos de la divulgación; o cualquier combinación de dos o más de lo anterior. Ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para introducirlos serán evidentes para el experto, y pueden comprender generalmente todos los grupos funcionales y técnicas mencionadas en la técnica anterior general citada anteriormente en el presente documento así como los grupos funcionales y técnicas conocidas *per se* para la modificación de proteínas farmacéuticas, y en particular para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (incluyendo ScFv y anticuerpos de dominios individuales), para lo que se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical

Sciences, 16ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Tales grupos funcionales pueden, por ejemplo, unirse directamente (por ejemplo, de manera covalente) a un Nanobody de la divulgación, u opcionalmente por medio de un ligador o espaciador adecuado, tal como será de nuevo evidente para el experto.

5 Una de las técnicas más ampliamente usadas para aumentar la semivida y/o reducir la inmunogenicidad de proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) o derivados de los mismos (tal como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). Generalmente, puede usarse cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de dominio (individual) y ScFv); se hace referencia a, por ejemplo, Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); de Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), de Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en el documento WO 04/060965. También están comercialmente disponibles diversos reactivos para la pegilación de proteínas, por ejemplo de Nektar Therapeutics, EE.UU.

15 Preferiblemente, se usa pegilación dirigida al sitio, en particular por medio de un residuo de cisteína (véase, por ejemplo Yang *et al.*, Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este propósito, PEG puede unirse a un residuo de cisteína que se produce de manera natural en un Nanobody de la divulgación, un Nanobody de la divulgación puede modificarse para introducir de manera adecuada uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o puede fusionarse una secuencia de inmunoglobulina que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG con el extremo N- y/o C-terminal de un Nanobody de la divulgación, todo usando técnicas de modificación por ingeniería genética de proteínas conocidas *per se* para el experto.

20 Preferiblemente, para los Nanobodies y proteínas de la divulgación, se usa un PEG con un peso molecular de más de 5000, tal como más de 10.000 y menos de 200.000, tal como menos de 100.000; por ejemplo en el intervalo de 20.000-80.000.

30 Otra, modificación habitualmente menos preferida comprende glicosilación unida a N o unida a O, habitualmente como parte de una modificación cotraduccional y/o postraduccional, según la célula huésped usada para expresar el Nanobody o polipéptido de la divulgación.

Aún otra modificación puede comprender la introducción de uno o más marcadores detectables u otros grupos o restos generadores de señales, según el uso previsto del Nanobody marcado. Los marcadores adecuados y técnicas para la unión, usando y detectándolos serán adecuados para el experto, y por ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los marcadores fluorescentes, marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, radioisótopos, metales, quelatos de metal, cationes metálicos, cromóforos y enzimas, tales como aquellos mencionados en la página 109 del documento WO 08/020079. Otros marcadores adecuados serán evidentes para el experto, y por ejemplo incluyen restos que pueden detectarse usando RMN o espectroscopía ESR.

40 Tales Nanobodies y polipéptidos de la divulgación marcados pueden, por ejemplo, usarse para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo inmunoensayos conocidos *per se* tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de tipo sándwich", etc.) así como fines de diagnóstico y obtención de imágenes *in vivo*, según la elección del marcador específico.

45 Tal como será evidente para el experto, otra modificación puede implicar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo para quelar uno de los metales o cationes metálicos a los que se hace referencia anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen, por ejemplo, sin limitación, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

50 Aún otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que es una parte de un par de unión específico, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Un grupo funcional de este tipo puede usarse para unir el Nanobody de la divulgación a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de unión, es decir, a través de la formación del par de unión. Por ejemplo, un Nanobody de la divulgación puede conjugarse con biotina, y unirse a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, un Nanobody conjugado de este tipo puede usarse como notificador, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico donde un agente productor de señales detectables se conjuga con avidina o estreptavidina. Tales pares de unión pueden, por ejemplo, usarse también para unir el Nanobody de la divulgación a un portador, incluyendo portadores adecuados para fines farmacéuticos. Un ejemplo no limitativo son las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh, Journal of Drug Targeting, 8, 4, 257 (2000). Tales pares de unión también pueden usarse para unir un agente terapéuticamente activo al Nanobody de la divulgación.

60 Para algunas aplicaciones, en particular para aquellas aplicaciones en las que se pretende destruir una célula que expresa la diana contra la cual se dirigen los Nanobodies de la divulgación (por ejemplo en el tratamiento de cáncer), o reducir o ralentizar el crecimiento y/o la proliferación de una célula de este tipo, los Nanobodies de la divulgación también pueden unirse a una toxina o a un residuo o resto tóxico. Ejemplos de residuos, compuestos o restos tóxicos que pueden unirse a un Nanobody de la divulgación para proporcionar, por ejemplo, un compuesto citotóxico serán evidentes para el experto y pueden, por ejemplo, encontrarse en la técnica anterior citada anteriormente y/o

en la descripción adicional en el presente documento. Un ejemplo es la denominada tecnología ADEPT™ descrita en el documento WO 03/055527.

5 Otras posibles modificaciones químicas y enzimáticas serán evidentes para el experto. Tales modificaciones también pueden introducirse para fines de investigación (por ejemplo, para estudiar relaciones de función-actividad). Se hace referencia, por ejemplo, a Lundblad y Bradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 143-151 (1997).

10 Preferiblemente, los derivados son tales que se unen a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afinidad (medida y/o expresada adecuadamente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off} , o alternativamente como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en el presente documento) que es tal como se define en el presente documento para los Nanobodies de la divulgación.

15 Tal como se mencionó anteriormente, la divulgación también se refiere a proteínas o polipéptidos que consisten en o comprenden esencialmente al menos un Nanobody de la divulgación. Por “consisten esencialmente en” quiere decirse que la secuencia de inmunoglobulina del polipéptido de la divulgación o bien es exactamente la misma que la secuencia de inmunoglobulina de un Nanobody de la divulgación o bien se corresponde con la secuencia de inmunoglobulina de un Nanobody de la divulgación que tiene un número limitado de residuos de aminoácido, tales como 1-20 residuos de aminoácido, por ejemplo 1-10 residuos de aminoácido y preferiblemente 1-6 residuos de aminoácido, tales como 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácido, añadidos en el extremo terminal amino, en el extremo terminal carboxilo, o en ambos, el extremo terminal amino y el extremo terminal carboxilo de la secuencia de inmunoglobulina del Nanobody.

25 Dichos residuos de aminoácido pueden o no cambiar, alterar o de otro modo influir en las propiedades (biológicas) del Nanobody y pueden o no añadir funcionalidad adicional al Nanobody. Por ejemplo, tales residuos de aminoácido:

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

30 - pueden formar una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción del Nanobody de una célula huésped tras la síntesis. Péptidos líderes secretorios adecuados serán evidentes para el experto, y pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Habitualmente, una secuencia líder de este tipo se unirá al extremo N-terminal del Nanobody, aunque la divulgación en su sentido más amplio no se limita a las mismas;

35 - pueden formar una secuencia o señal que permite que el Nanobody se dirija hacia y/o que penetre o entre en órganos específicos, tejidos, células, o partes o compartimentos de células, y/o que permiten que el Nanobody penetre o cruce una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa celular tal como una capa de células epiteliales, un tumor incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de tales secuencias de inmunoglobulina serán evidentes para el experto e incluyen los mencionados en el párrafo c) en la página 112 del documento WO 08/020079.

40 - Pueden formar una “etiqueta”, por ejemplo una secuencia de inmunoglobulina o residuo que permite o facilita la purificación del Nanobody, por ejemplo, usando técnicas de afinidad dirigidas contra dicha secuencia o residuo. Después de eso, dicha secuencia o residuo puede retirarse (por ejemplo, mediante escisión química o enzimática) para proporcionar la secuencia de Nanobody (para este propósito, la etiqueta puede unirse opcionalmente a la secuencia de Nanobody por medio de una secuencia ligadora escindible o contener un motivo escindible). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos de tales residuos son múltiples residuos de histidina, residuos de glutatión y una etiqueta myc (véase, por ejemplo SEQ ID NO: 31 del documento WO 06/12282).

50 - Pueden ser uno o más residuos de aminoácido que se han funcionalizado y/o que pueden servir como sitio para la unión de grupos funcionales. Los residuos de aminoácido y grupos funcionales adecuados serán evidentes para el experto e incluyen, pero no se limitan a, los residuos de aminoácido y grupos funcionales mencionados en el presente documento para los derivados de los Nanobodies de la divulgación.

55 Vacunación con ADN en camélidos

La vacunación con ADN se ha usado ampliamente para inducir respuestas inmunitarias en animales experimentales, tales como ratas, ratones y conejos (véase, por ejemplo Tang *et al.*, *Nature*, 1992; Nagata *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 2003; Bins *et al.*, *Nature Med.* 2005; Bins *et al.*, *J. Immunol.*, 2007; Kilpatrick *et al.*, *Hybridoma*, 1998). Sin embargo, la vacunación con ADN de animales más grandes se ha considerado difícil, si no imposible. En particular, los informes sobre la vacunación con ADN de camélidos son escasos. El informe de Koch Nolte *et al.*, 2007, describe un procedimiento largo y engorroso que requiere no menos de 8 rondas de vacunación con ADN, a intervalos de 6-12 semanas, en combinación con dos rondas adicionales de refuerzo proteico. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado para la vacunación con ADN de animales grandes, en particular camélidos.

a) Generación de secuencias de inmunoglobulina sin refuerzo proteico

En una realización particular, la presente divulgación se refiere a un método para generar secuencias de inmunoglobulina en un animal no humano, específicamente en un camélido, más específicamente una llama, mediante vacunación genética, sin refuerzo proteico.

Se ha demostrado previamente en no camélidos, por ejemplo en ratones, que pueden obtenerse respuestas de anticuerpo sérico policlonales tras la vacunación con ADN, sin refuerzo con un antígeno de proteína (por ejemplo Bins *et al.*, Nature Medicine, 2005; Bins *et al.*, J. Immunol. 2007). Sin embargo, se conoce que tales respuestas de anticuerpo policlonales no son suficientes para generar de manera eficaz anticuerpos monoclonales específicos de antígeno (Nagata *et al.*, 2003). Los autores notifican un rendimiento de hibridoma específico que era “casi despreciable” (0,0-1,3 / 10E8 células de bazo) en ratones en ausencia de un refuerzo proteico.

Se sabe generalmente que la vacunación genética de animales más grandes, en particular camélidos, es mucho menos eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en comparación con ratones. La producción de secuencias de inmunoglobulina mediante el uso de vacunación genética en camélidos se ha considerado, por tanto, imposible.

Koch-Nolte *et al.* 2007 describen la inmunización de una llama con una estrategia de sensibilización de ADN-refuerzo proteico para obtener anticuerpos de dominio individual contra ecto-ADP-ribosiltransferasa ART2.2. Este procedimiento, sin embargo, se caracteriza por baja eficiencia y requirió un refuerzo extensivo. Más específicamente, una llama recibió cuatro inmunizaciones mediante pistola génica intradérmicas con un vector de expresión que codifica para ART2.2 a intervalos de 6 a 12 semanas (12 inyecciones de 1 µg de ADN/mg de oro a un ajuste de presión de 300 psi). Se requirieron cuatro inmunizaciones de ADN de refuerzo posteriores y dos refuerzos proteicos adicionales usando ART2.2 recombinante, con el propósito de obtener una respuesta inmunitaria satisfactoria. En general, este procedimiento se extiende a lo largo de varios meses antes de lograr una respuesta inmunitaria adecuada en el animal, y necesita refuerzo proteico múltiple.

En vista de esta enseñanza de la técnica anterior, es un hallazgo sorprendente de la presente divulgación que al usar los métodos tal como se describe en el presente documento, puede lograrse una respuesta inmunitaria adecuada en camélidos, en particular llamas, sin un refuerzo proteico. En otras palabras, la vacunación genética sola puede ser suficiente para inducir una respuesta inmunitaria que sea adecuada para la generación de secuencias de inmunoglobulina mediante examen posterior. En particular, se ha encontrado sorprendentemente que incluso si la respuesta de anticuerpo sérico es baja en comparación con estrategias de inmunización convencionales, la vacunación con ADN solo es suficiente para lograr buenas “tasas de aciertos”, es decir, para obtener secuencias de inmunoglobulina específicas de antígeno a una frecuencia aceptable.

b) Generación de respuestas anticuerpo frente a antígenos asociados a células

Tal como se señala en la sección de introducción, la técnica no proporciona medios adecuados para generar respuestas de anticuerpo frente a antígenos que están asociados a células tal como se define en el presente documento.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que mediante la vacunación genética de camélidos, preferiblemente llamas, pueden generarse respuestas de anticuerpo, que se caracterizan por una amplitud mejorada del repertorio así como una especificidad mejorada en comparación con los intentos de la técnica anterior.

Los antígenos asociados a células, más específicamente aquellos con dominios transmembrana individuales o múltiples, son difíciles de purificar en su conformación natural. Con el fin de obtener secuencias de inmunoglobulina, incluyendo Nanobodies, contra epítopos nativos, es crucial administrar el antígeno diana a la llama en su conformación nativa. Para estos antígenos asociados a células, la inmunización con células completas que expresan funcionalmente el antígeno es la estrategia preferida (tal como se realizó, por ejemplo, en los documentos WO 05/044858; WO 07/042289; US 61/004,332). La principal desventaja de inmunizaciones de célula completa es el hecho de que otros muchos antígenos (marcadores de la superficie celular) también se presentan en el sistema inmunitario del animal, lo que da como resultado una respuesta inmunitaria específica de la diana muy diluida. Para aumentar la especificidad, se han ideado estrategias de sensibilización-refuerzo elaboradas y técnicamente complejas. En la medida en que cualquiera de estas etapas incluye el uso de proteína o péptidos desnaturalizados, la respuesta de anticuerpo resultante estará sesgada a la desventaja de epítopos conformacionales. Por tanto, la amplitud del espectro obtenible de secuencias de inmunoglobulina estará limitada. Además, los enfoques solamente basados en células, es decir enfoques que usan células que expresan el antígeno diana para inmunización, se caracterizarán por mala especificidad de las secuencias de inmunoglobulina, haciendo que un aislamiento eficaz de las secuencias de inmunoglobulina de interés sea imposible.

Koch-Nolte *et al.* 2007 describen la inmunización de una llama con una estrategia de sensibilización de ADN-refuerzo proteico para obtener anticuerpos de dominio individual contra ecto-ADP-ribosiltransferasa ART2.2. Ecto-ADP-ribosiltransferasa ART2.2 es una proteína anclada a Gpi, caracterizada por una inserción de membrana por medio de una cola lipídica pero sin un dominio transmembrana. Para esta proteína, podría prepararse una proteína

purificada correctamente plegada para el refuerzo. Por tanto, podría realizarse un refuerzo con la proteína purificada. Tal como se indicó anteriormente, proteína purificada de antígenos asociados a células que están anclados dentro de, o ubicados en la membrana no pueden obtenerse en forma purificada en su conformación natural. Cualquier preparación purificada habrá perdido los epítomos conformacionales dependientes de membrana. Y por tanto, un refuerzo con proteína purificada de estos antígenos asociados a células no es posible.

En el contexto de proteínas transmembrana, y en particular proteínas con múltiples dominios transmembrana, epítomos conformacionales, y en particular epítomos conformacionales dependientes de membrana son de particular interés como dianas para secuencias de inmunoglobulina. Por ejemplo, el poro de un canal iónico representa una diana de importancia terapéutica primaria. Sin embargo, mediante el uso de enfoques convencionales, es casi imposible generar secuencias de inmunoglobulina que reconocen una diana de este tipo. Para permanecer con el ejemplo, la región de poro de un canal iónico se forma mediante múltiples dominios que atraviesan la membrana, y posiblemente incluso múltiples subunidades del canal. Es casi imposible proporcionar péptidos para la generación de secuencias de inmunoglobulina que se unen a esta región de poro. Además, dado que la proteína sólo presentará su conformación natural en el entorno de la membrana, la proteína de canal iónico purificada no puede usarse para inmunización.

La presente divulgación proporciona la generación de secuencias de inmunoglobulina para tal tipo de epítomo conformacional, y excluye la necesidad de refuerzo con proteína purificada.

En la invención, se prevé que después de la vacunación genética (que proporciona la especificidad de la respuesta inmunitaria necesaria), un animal se refuerza con células que expresan la proteína en su conformación natural, es decir, incrustadas/ ancladas en la membrana. Incluso aunque estas células expresen una multitud de antígenos, la respuesta de recuerdo inmunológico sólo se producirá para el antígeno que se ha administrado mediante vacunación genética. Por tanto, sensibilizar el animal con vacunación genética permite un refuerzo con proteína en su conformación natural, incluso si la proteína no está purificada, por ejemplo en el contexto de una célula que expresa la proteína, pero sin embargo, obteniendo un repertorio muy específico de secuencias de inmunoglobulina.

En una realización preferida, la invención se refiere a la generación de secuencias de inmunoglobulina en camélidos, en particular llama. La respuesta de anticuerpo de estos animales se caracteriza por la existencia de secuencias de inmunoglobulina que pueden extenderse en, y específicamente unirse a surcos o grietas en un antígeno diana. Esto es de particular importancia y beneficio en el caso de epítomos conformacionales de antígenos asociados a células

Por tanto, en una realización específica la presente divulgación se refiere al uso de vacunación genética de camélidos, para producir secuencias de inmunoglobulina contra epítomos conformacionales de antígenos asociados a células, en particular antígenos que presentan uno o múltiples dominios que atraviesan la membrana.

Los principios generales de la presente invención tal como se exponen anteriormente se ejemplificarán ahora por referencia a aspectos, experimentos y reivindicaciones preferidos específicos. Sin embargo, la invención no debe entenderse que está limitada por los mismos.

Todo el contenido de todas las referencias (incluyendo referencias de bibliografía, patentes expedidas, solicitudes de patente publicadas y solicitudes de patentes en tramitación junto con la presente) citadas en la totalidad de esta solicitud se incorporan de ese modo expresamente como referencia.

Aspectos preferidos de la divulgación:

Aspecto A-1: una secuencia de inmunoglobulina que se dirige contra y/o que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto A-2: una secuencia de inmunoglobulina según el aspecto A-1, que está en forma esencialmente aislada.

Aspecto A-3: una secuencia de inmunoglobulina según el aspecto A-1 o A-2, para administración a un sujeto, en la que dicha secuencia de inmunoglobulina no se produce de manera natural en dicho sujeto.

Aspecto A-4: una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 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. Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores.

Aspecto A-5: una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores.

Aspecto A-6: una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) entre 1 s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} , 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} . Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores.

Aspecto A-7: una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 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. Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores.

Aspecto A-8: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que es una secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética.

Aspecto A-9: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que comprende un pliegue de inmunoglobulina o que en condiciones adecuadas es capaz de formar un pliegue de inmunoglobulina.

Aspecto A-10: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente).

Aspecto A-11: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que es una secuencia de inmunoglobulina.

Aspecto A-12: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que es una secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética.

Aspecto A-13: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores que es una secuencia de inmunoglobulina humanizada, una secuencia de inmunoglobulina camelizada o una secuencia de inmunoglobulina que se ha obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad.

Aspecto A-14: secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia de V_L); o de una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia de V_H).

Aspecto A-15: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de anticuerpo de cadena pesada.

Aspecto A-16: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en un anticuerpo de dominio (o una secuencia de inmunoglobulina A_n que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), de un anticuerpo de dominio individual (o una secuencia de inmunoglobulina A_n que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio individual), de un "dAb" (o una secuencia de inmunoglobulina A_n que es adecuada para su uso como dAb) o de un Nanobody (incluyendo pero sin limitarse a una secuencia de V_{HH}).

Aspecto A-17: secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en un Nanobody.

Aspecto A-18: secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en un Nanobody que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina A_n de SEQ ID NO: 1 a 22, en la que para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en la que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto A-19: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en un polipéptido que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 789 a 791, en la que para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en la que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto A-20: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en un Nanobody que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, o 778 a 780, más preferido SEQ ID NO 732, 773 o 778, en la que para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en la que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto A-21: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que consiste esencialmente en un Nanobody humanizado.

Aspecto A-22: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos anteriores, que además del al menos un sitio de unión para la unión contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, contiene uno o más sitios de unión adicionales para la unión contra otros antígenos, proteínas o dianas.

Aspectos basados en CDR

Aspecto B-1: una secuencia de inmunoglobulina que se dirige contra y/o que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, y que comprende uno o más tramos de residuos de aminoácido elegidos del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

o cualquier combinación adecuada de las mismas.

Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22.

Aspecto B-2: una secuencia de inmunoglobulina según el aspecto B-1, en la que al menos uno de dichos tramos de

residuos de aminoácido forma parte del sitio de unión a antígeno para la unión contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto B-3: una secuencia de inmunoglobulina que se dirige contra y/o que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y que comprende dos o más tramos de residuos de aminoácido elegidos del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

de modo que (i) cuando el primer tramo de residuos de aminoácido corresponde a una de las secuencias de inmunoglobulina según a), b) o c), el segundo tramo de residuos de aminoácido corresponde a una de las secuencias de inmunoglobulina según d), e), f), g), h) o i); (ii) cuando el primer tramo de residuos de aminoácido corresponde a una de las secuencias de inmunoglobulina según d), e) o f), el segundo tramo de residuos de aminoácido corresponde a una de las secuencias de inmunoglobulina según a), b), c), g), h) o i); o (iii) cuando el primer tramo de residuos de aminoácido corresponde a una de las secuencias de inmunoglobulina según g), h) o i), el segundo tramo de residuos de aminoácido corresponde a una de las secuencias de inmunoglobulina según a), b), c), d), e) o f).

Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 o B-2.

Aspecto B-4: una secuencia de inmunoglobulina según el aspecto B-3, en la que los al menos dos tramos de residuos de aminoácido forman parte del sitio de unión a antígeno para la unión contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto B-5: una secuencia de inmunoglobulina que se dirige contra y/o que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y que comprende tres o más tramos de residuos de aminoácido, en la que el primer tramo de residuos de aminoácido se elige del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

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

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

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

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617.

Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22 y/o B-1 a B-4.

Aspecto B-6: una secuencia de inmunoglobulina según el aspecto B-5, en la que los al menos tres tramos de residuos de aminoácido forman parte del sitio de unión a antígeno para la unión contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto B-7: una secuencia de inmunoglobulina que se dirige contra y/o que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 en la que las secuencias de CDR de dicha secuencia de inmunoglobulina tienen al menos una identidad de aminoácidos del 70%, preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 80%, más preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 90%, tal como una identidad de aminoácidos del 95% o más o incluso esencialmente una identidad de aminoácidos del 100% con las secuencias de CDR de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778. Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22 y/o B-1 a B-6.

Aspecto C-1: una secuencia de inmunoglobulina que se dirige contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y que bloquea de manera cruzada la unión de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778 a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7. Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22 y/o según aspectos B-1 a B-7. También, preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto C-2: una secuencia de inmunoglobulina que se dirige contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y que está bloqueada de manera cruzada frente a la unión a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 mediante al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778. Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22 y/o según aspectos B-1 a B-7. También, preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina de este tipo puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto C-3: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos C-1 o C-2, en la que la capacidad de dicha secuencia de inmunoglobulina de bloquear de manera cruzada o de bloquearse de manera cruzada se detecta en un ensayo de Biacore.

Aspecto C-4: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos C-1 a C-3 en la que la capacidad de dicha secuencia de inmunoglobulina de bloquear de manera cruzada o de bloquearse de manera cruzada se detecta en un ensayo de ELISA.

Aspecto D-1: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7 o C-1 a C-7, que está en forma esencialmente aislada.

Aspecto D-2: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, y/o D1 para su administración a un sujeto, en la que dicha secuencia de inmunoglobulina no se produce de manera natural en dicho sujeto.

Aspecto D-3: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, y/o D1 a D-2 que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro.

Aspecto D-4: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, y/o D-1 a D-3 que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Aspecto D-5: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, y/o D-1 a D-4 que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) de entre 1 s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} 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} .

Aspecto D-6: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, y/o D-1 a D-5 que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM.

Las secuencias de inmunoglobulina según los aspectos D-1 a D-6 pueden ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22.

Aspecto E-1: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7 y/o D1 a D-6, que es una secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética.

Aspecto E-2: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 que comprende un pliegue de inmunoglobulina o que en condiciones adecuadas es capaz de formar un pliegue de inmunoglobulina.

Aspecto E-3: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o D-1 o D-2, que es una secuencia de inmunoglobulina.

Aspecto E-4: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-3, que es una secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética.

Aspecto E-5: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-4 que es una secuencia de inmunoglobulina humanizada, una secuencia de inmunoglobulina camelizada o una secuencia de inmunoglobulina que se ha obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad.

Aspecto E-6: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-5 que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia de V_L); o de una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia de V_H).

Aspecto E-7: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-6, que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cadena pesada.

Aspecto E-8: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-7, que consiste esencialmente en un anticuerpo de dominio (o una secuencia de inmunoglobulina An que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), de un anticuerpo de dominio individual (o una secuencia de inmunoglobulina An que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio individual), de un "dAb" (o una secuencia de inmunoglobulina An que es adecuada para su uso como dAb) o de un Nanobody (que incluye pero no se limita a una secuencia de V_{HH}).

Aspecto E-9: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-8 que consiste esencialmente en un Nanobody.

Aspecto E-10: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-9 que consiste esencialmente en un Nanobody que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 1 a 22, en las que con el propósito de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en el que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto E-11: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-10, que consiste esencialmente en un Nanobody que

- 5 i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina An de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778, en las que con el propósito de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

10 y en el que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

- 15 Aspecto E-12: secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-11 que consiste esencialmente en un Nanobody humanizado.

Aspecto E-13: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos B-1 a B-7, C-1 a C-7, D1 a D-6, y/o E-1 a E-11, que además del al menos un sitio de unión para la unión formado por las secuencias de CDR, contiene uno o más sitios de unión adicionales para la unión contra otros antígenos, proteínas o dianas.

20 Las secuencias de inmunoglobulina según los aspectos E-1 a E-13 pueden ser en particular una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22.

25 Aspectos de región de entramado + CDR

Aspecto F-1: una secuencia de inmunoglobulina que consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementareidad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en la que:

30 - CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

- 35 b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

40 y/o

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

- 45 d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

- 50 f) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

y/o

55 - CDR3 se elige del grupo que consiste en:

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

- 60 h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617.

- 65 Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo se dirige preferiblemente contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y/o una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a canales iónicos tales

como, por ejemplo, P2X7. Además, una secuencia de inmunoglobulina de este tipo es preferiblemente una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, C-1 a C-7, D1 a D-6 y/o E-1 a E-13.

Aspecto F-2: una secuencia de inmunoglobulina que consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementareidad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en la que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

y

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617.

Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo se dirige preferiblemente contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y/o una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7. También, una secuencia de inmunoglobulina de este tipo es preferiblemente una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, C-1 a C-7, D1 a D-6 y/o E-1 a E-13.

Aspecto F-3: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 y F-2, en la que las secuencias de CDR de dicha secuencia de inmunoglobulina tienen al menos una identidad de aminoácidos del 70%, preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 80%, más preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 90%, tal como una identidad de aminoácidos del 95% o más o incluso esencialmente una identidad de aminoácidos del 100% con las secuencias de CDR de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778.

Una secuencia de inmunoglobulina de este tipo se dirige preferiblemente contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y/o una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7. Además, una secuencia de inmunoglobulina de este tipo es preferiblemente una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, C-1 a C-7, D1 a D-6 y/o E-1 a E-13.

Aspecto F-4: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-3 que se dirige contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y que bloquea de manera cruzada la unión de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778.

Aspecto F-5: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-3 que se dirige contra

canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y que está bloqueada de manera cruzada frente a la unión a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 mediante al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778.

- 5 Aspecto F-6: secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-4 o F-5 en la que la capacidad de dicha secuencia de inmunoglobulina de bloquear de manera cruzada o de bloquearse de manera cruzada se detecta en un ensayo de Biacore.
- 10 Aspecto F-7: secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-4 o F-5 en la que la capacidad de dicha secuencia de inmunoglobulina de bloquear de manera cruzada o de bloquearse de manera cruzada se detecta en un ensayo de ELISA.
- 15 Aspecto F-8: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-7, que está en forma esencialmente aislada.
- Aspecto F-9: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-8, para su administración a un sujeto, en la que dicha una secuencia de inmunoglobulina no se produce de manera natural en dicho sujeto.
- 20 Aspecto F-10: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-9, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro.
- 25 Aspecto F-11: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-10, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.
- 30 Aspecto F-12: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-11, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) de entre 1 s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} 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} .
- 35 Aspecto F-13: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-12, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM.
- Aspecto F-14: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-13, que es una
- 40 secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética.
- Aspecto F-15: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-14, que comprende un pliegue de inmunoglobulina o que en condiciones adecuadas es capaz de formar un pliegue de inmunoglobulina.
- 45 Aspecto F-16: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-15, que es una secuencia de inmunoglobulina.
- Aspecto F-17: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-16, que es una
- 50 secuencia de inmunoglobulina que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semisintética.
- Aspecto F-18: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-17, que es una
- 55 secuencia de inmunoglobulina humanizada, una secuencia de inmunoglobulina camelizada o una secuencia de inmunoglobulina que se ha obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad.
- Aspecto F-19: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-19, que consiste
- 60 esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia de V_L); o de una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia de V_H).
- Aspecto F-20: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-19, que consiste
- 65 esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o que consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cadena pesada.
- Aspecto F-21: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-20, que consiste

esencialmente en un anticuerpo de dominio (o una secuencia de inmunoglobulina que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), de un anticuerpo de dominio individual (o una secuencia de inmunoglobulina que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio individual), de un "dAb" (o una secuencia de inmunoglobulina que es adecuada para su uso como dAb) o de un Nanobody (que incluye pero no se limita a una secuencia de V_{HH}).

Aspecto F-22: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-21, que consiste esencialmente en un Nanobody.

Aspecto F-23: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-22, que consiste esencialmente en un Nanobody que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 1 a 22, en el que con el propósito de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en el que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto F-24: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-23, que consiste esencialmente en un Nanobody que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778, en el que con el propósito de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en el que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto F-25: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos F-1 a F-24, que consiste esencialmente en un Nanobody humanizado.

Aspecto G-1: una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos precedentes, que además del al menos un sitio de unión para la unión formado por las secuencias de CDR, contiene uno o más sitios de unión adicionales para la unión contra otro antígeno, proteína o diana.

Aspecto H-1: Nanobody que se dirige contra y/o que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto H-2: Nanobody según el aspecto H-1, que está en forma esencialmente aislada.

Aspecto H-3: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-2, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro.

Aspecto H-4: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-3, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y 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 $M^{-1}s^{-1}$.

Aspecto H-5: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-4, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) de entre 1 s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} 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} .

Aspecto H-6: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-5, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM.

Aspecto H-7: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-6, que es un Nanobody que se produce de manera natural (de cualquier especie adecuada) o un Nanobody sintético o semisintético.

Aspecto H-8: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-7, que es una secuencia de V_{HH} , una secuencia

de V_{HH} parcialmente humanizada, una secuencia de V_{HH} totalmente humanizada, un dominio variable de cadena pesada camelizado o un Nanobody que se ha obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad.

Aspecto H-9: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-8, que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina An de SEQ ID NO: 1 a 22, en el que con el propósito de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en el que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto H-10: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-9, que

i) tiene al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina An de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778, en el que con el propósito de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR se descartan;

y en el que:

ii) preferiblemente uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla B-2.

Aspecto H-11: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-10, en el que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

y/o

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

y/o

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617.

Aspecto H-12: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-11, en el que:

- CDR1 se elige del grupo que consiste en:

a) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

b) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

c) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 208 a 289;

y

- CDR2 se elige del grupo que consiste en:

d) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

e) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

f) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 372 a 453;

y

- CDR3 se elige del grupo que consiste en:

g) las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

h) secuencias de inmunoglobulina que tienen al menos una identidad de aminoácidos del 80% con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617;

i) secuencias de inmunoglobulina que tienen 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 536 a 617.

Aspecto H-13: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-12, en el que las secuencias de CDR tienen al menos una identidad de aminoácidos del 70%, preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 80%, más preferiblemente al menos una identidad de aminoácidos del 90%, tal como una identidad de aminoácidos del 95% o más o incluso esencialmente una identidad de aminoácidos del 100% con las secuencias de CDR de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778.

Aspecto H-14: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-13, que es un Nanobody parcialmente humanizado.

Aspecto H-15: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-14, que es un Nanobody totalmente humanizado.

Aspecto H-16: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-15, que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778 o del grupo que consiste en secuencias de inmunoglobulina que tienen una identidad de secuencia de más del 80%, preferiblemente más del 90%, más preferiblemente más del 95%, tal como el 99% o más (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778.

Aspecto H-17: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-16, que es un Nanobody humanizado.

Aspecto H-18: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-17, que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 .

Aspecto H-19: Nanobody dirigido contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 que bloquea de manera cruzada la unión de al menos una de las secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778 a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto H-20: Nanobody dirigido contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 que está bloqueado de manera cruzada frente a la unión a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 mediante al menos una de las

secuencias de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778.

5 Aspecto H-21: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-19 o H-20 en el que la capacidad de dicho Nanobody de bloquear de manera cruzada o de bloquearse de manera cruzada se detecta en un ensayo de Biacore.

Aspecto H-22: Nanobody según cualquiera de los aspectos H-19 a H-21 en el que la capacidad de dicho Nanobody de bloquear de manera cruzada o de bloquearse de manera cruzada se detecta en un ensayo de ELISA.

10 Polipéptidos.

Aspecto K-1: Polipéptido que comprende o consiste esencialmente en una o más secuencias de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 y/o uno o más Nanobodies según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, y opcionalmente comprende además uno o más ligadores peptídicos.

Aspecto K-2: Polipéptido según el aspecto K-1, en el que dichas una o más unidades de unión son secuencias de inmunoglobulina.

20 Aspecto K-3: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 o K-2, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio individual, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio individual, "dAb", secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies.

25 Aspecto K-4: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-3, en el que dichas una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación son secuencias de inmunoglobulina.

30 Aspecto K-5: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-4, en el que dichas una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio individual, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio individual, "dAb", secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies.

35 Aspecto K-6: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-5, que comprende o consiste esencialmente en uno o más Nanobodies según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 y en el que dichas una o más de otras unidades de unión son Nanobodies.

40 Aspecto K-7: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-6, en el que al menos una unidad de unión es un constructo multivalente.

Aspecto K-8: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-8, en el que al menos una unidad de unión es un constructo multiparatópico.

45 Aspecto K-9: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-8, en el que al menos una unidad de unión es un constructo multiespecífico.

50 Aspecto K-10: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-9, que tiene una semivida aumentada, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.

55 Aspecto K-11: Polipéptido según el aspecto K-10, en el que dichas una o más de otras unidades de unión proporcionan el polipéptido con semivida aumentada, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.

60 Aspecto K-12: Polipéptido según el aspecto K-10 o K-11, en el que dichas una o más de otras unidades de unión que proporcionan el polipéptido con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una porción Fc, y proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas.

65 Aspecto K-13: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-10 a K-12, en el que dichas una o más de otras unidades de unión que proporcionan el polipéptido con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en albúmina sérica humana o fragmentos de la misma.

Aspecto K-14: Polipéptido según cualquiera del aspecto K-10 a K-13, en el que dichas una o más de otras unidades de unión que proporcionan el polipéptido con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a albúmina sérica (tal como albúmina sérica humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

Aspecto K-15: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-10 a K-14, en el que dichas una o más de otras unidades de unión que proporcionan el polipéptido con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio individual, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio individual, "dAb", secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies que pueden unirse a albúmina sérica (tal como albúmina sérica humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

Aspecto K-16: Polipéptido según el aspecto K-10 a K-15, en el que dichas una o más de otras unidades de unión que proporcionan el polipéptido con semivida aumentada es un Nanobody que puede unirse a albúmina sérica (tal como albúmina sérica humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

Aspecto K-17: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-10 a K-16, que tiene una semivida en suero que es de al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.

Aspecto K-18: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-10 a K-17, que tiene una semivida en suero que se aumenta en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 ó 72 horas, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.

Aspecto K-19: Polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-18, que tiene una semivida en suero en humano de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más; por ejemplo, de al menos 5 días (tal como aproximadamente de 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como aproximadamente de 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como aproximadamente de 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente de 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente de 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente de 14 a 19 días).

Compuesto o constructo.

Aspecto L-1: Compuesto o constructo, que comprende o consiste esencialmente en una o más secuencias de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 y/o uno o más Nanobodies según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, y opcionalmente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más ligadores.

Aspecto L-2: Compuesto o constructo según el aspecto L-1, en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto L-3: Compuesto o constructo según el aspecto L-1 o L-2, en el que dichos uno o más ligadores, si están presentes, son una o más secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto L-4: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-3, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto L-5: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-4, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio individual, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio individual, "dAb", secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies.

Aspecto L-6: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-5, en el que dichas una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación son secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto L-7: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-6, en el que dichas una o más secuencias de inmunoglobulina de la divulgación se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio,

secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio individual, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio individual, "dAb", secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies.

- 5 Aspecto L-8: Compuesto o constructo, que comprende o consiste esencialmente en uno o más Nanobodies según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 y en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son Nanobodies.
- 10 Aspecto L-9: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-9, que es un constructo multivalente.
- 15 Aspecto L-10: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-10, que es un constructo multiespecífico.
- 20 Aspecto L-11: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-10, que tiene una semivida aumentada, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.
- 25 Aspecto L-12: Compuesto o constructo según el aspecto L-1 a L-11, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión proporcionan el compuesto o constructo con semivida aumentada, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.
- 30 Aspecto L-13: Compuesto o constructo según el aspecto L-12, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan el compuesto o constructo con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una porción Fc, y proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas.
- 35 Aspecto L-14: Compuesto o constructo según el aspecto L-12 o L-13, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan el compuesto o constructo con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en albúmina sérica humana o fragmentos de la misma.
- 40 Aspecto L-15: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-12 a L-14, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan el compuesto o constructo con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a albúmina sérica (tal como albúmina sérica humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).
- 45 Aspecto L-16: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-12 a L-14, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan el compuesto o constructo con semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio individual, "dAb", secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies que pueden unirse a albúmina sérica (tal como albúmina sérica humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).
- 50 Aspecto L-17: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-12 a L-14, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan el compuesto o constructo con semivida aumentada es un Nanobody que puede unirse a albúmina sérica (tal como albúmina sérica humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).
- 55 Aspecto L-18: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-12 a L-17, que tiene una semivida en suero que es de al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.
- 60 Aspecto L-19: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-12 a L-18, que tiene una semivida en suero que se aumenta en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 ó 72 horas, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se* o Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, respectivamente.
- 65 Aspecto L-20: Compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-12 a L-19, que tiene una semivida en suero en humano de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más; por ejemplo, de al menos 5 días (tal

como aproximadamente de 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como aproximadamente de 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como aproximadamente de 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente de 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente de 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente de 14 a 19 días).

Aspecto L-21: Constructo monovalente, que comprende o que consiste esencialmente en una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 y/o un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22.

Aspecto L-22: Constructo monovalente según el aspecto L-21, en el que dicha secuencia de inmunoglobulina de la divulgación se elige del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio individual, secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio individual, "dAb", secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies.

Aspecto L-23: Constructo monovalente, que comprende o que consiste esencialmente en un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22.

Ácido nucleico

Aspecto M-1: Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos, que codifica para una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22.

Aspecto M-2: Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos, que codifica para un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos anteriores.

Célula huésped

Aspecto N-1: Huésped o célula huésped que expresa, o que en circunstancias adecuadas es capaz de expresar, una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21 que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifican para los mismos, o un constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23; y/o que comprende un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-1 o un constructo genético según el aspecto M-2.

Composiciones

Aspecto O-1: Composición que comprende al menos una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23, o ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según los aspectos M-1 o M-2.

Aspecto O-2: Composición según el aspecto O-1, que es una composición farmacéutica.

Aspecto O-3: Composición según el aspecto O-2, que es una composición farmacéutica, que comprende además al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y que comprende opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

Elaboración de agente y composición de la divulgación

Aspecto P-1: Método para producir una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21 que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica para los mismos, o un constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) expresar, en una célula huésped o un organismo huésped adecuados o en otro sistema de expresión adecuado, un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto M-1, o un constructo genético según el aspecto M-2;

seguido opcionalmente por:

b) aislar y/o purificar la secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, o un constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23 así obtenidos.

Aspecto P-2: Método para producir una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21 que es tal que puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifican para los mismos, o un constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) cultivar y/o mantener un huésped o una célula huésped según el aspecto.... en condiciones que son tales que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce al menos una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, o constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23;

seguido opcionalmente por:

b) aislar y/o purificar la secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, o constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23 así obtenidos.

Método de examen

Aspecto Q-1: Método para examinar secuencias de inmunoglobulina dirigidas contra canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 que comprende al menos las etapas de:

a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifican para secuencias de inmunoglobulina;

b) examinar dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico para secuencias de ácido nucleico que codifican para una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tiene afinidad por canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 y que está bloqueada de manera cruzada o está bloqueando de manera cruzada un Nanobody de la divulgación, por ejemplo SEQ ID NO: 705 a 788, más preferiblemente SEQ ID NO 726 a 750, 753 a 758, 762 a 764, 772 a 773, 775, ó 778 a 780, más preferidas SEQ ID NO 732, 773 ó 778 (tabla A-1) o un polipéptido o constructo de la divulgación, por ejemplo SEQ ID NO: 789 a 791 (véase la tabla A-3); y

c) aislar dicha secuencia de ácido nucleico, seguido por expresar dicha secuencia de inmunoglobulina.

Uso de agente de unión de la divulgación

Aspecto R-1: Método para la prevención y/o el tratamiento de al menos un [insértense enfermedades y trastornos], comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23; o composición según el aspecto O-2 u O-3.

Aspecto R-2: Método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que se asocia con canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, con su actividad biológica o farmacológica, y/o con las rutas biológicas o señalización en que están implicados canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23; o composición según el aspecto O-2 u O-3.

Aspecto R-3: Método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede prevenirse y/o tratarse administrando, a un sujeto que lo necesite, al menos una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, constructo monovalente según cualquiera de

los aspectos L-22 o L-23; o composición según el aspecto O-2 u O-3, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23; o composición según el aspecto O-2 u O-3.

Aspecto R-4: Método para inmunoterapia, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23; o composición según el aspecto O-2 u O-3.

Aspecto R-5: Uso de una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, un compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, o un constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23 en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de al menos un [insértense enfermedades y trastornos]; y/o para su uso en uno o más de los métodos según aspectos R-1 a R-3.

Aspecto R-6: Secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-21, constructo monovalente según cualquiera de los aspectos L-22 o L-23; o composición según el aspecto O-2 u O-3 para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno en el que un canal iónico juega un papel o está implicado.

Aspectos de fragmento

Aspecto S-1: Parte o fragmento de una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, o de un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22.

Aspecto S-2: Parte o fragmento según el aspecto S-1, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.

Aspecto S-3: Parte de fragmento según cualquiera de los aspectos S-1 o S-2, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro.

Aspecto S-4: Parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-1 a S-3, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y 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 $M^{-1}s^{-1}$.

Aspecto S-5: Parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-1 a S-4, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) entre 1 s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} 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} .

Aspecto S-6: Compuesto o constructo, que comprende o consiste esencialmente en una o más partes o fragmentos según cualquiera de los aspectos S-1 a S-4, y opcionalmente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más ligadores.

Aspecto S-7: Compuesto o constructo según el aspecto S-6, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto S-8: Compuesto o constructo según el aspecto S-6 o S-7, en el que dichos uno o más ligadores, si están presentes, son una o más secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto S-9: Ácido nucleico o secuencia de nucleótidos, que codifica para una parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-1 a S-7 o un compuesto o constructo según el aspecto S-8.

Aspecto S-10: Composición, que comprende al menos una parte o fragmento según cualquiera de los aspectos S-1 a S-7, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos S-6 a S-8, o ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto S-9.

Aspectos de derivados

- 5 Aspecto T-1: Derivado de una secuencia de inmunoglobulina según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1, o de un Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22.
- 10 Aspecto T-2: Derivado según el aspecto T-1, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.
- 15 Aspecto T-3: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 o T-2, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro.
- 20 Aspecto T-4: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-3, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y 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 $M^{-1}s^{-1}$.
- 25 Aspecto T-5: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-4, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) de entre 1 s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} , 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} .
- Aspecto T-6: Derivado de un polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19 o compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-23.
- 30 Aspecto T-7: Derivado según el aspecto T-6, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7.
- 35 Aspecto T-8: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 o T-7, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro.
- Aspecto T-9: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 a T-8, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y 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 $M^{-1}s^{-1}$.
- 40 Aspecto T-10: Derivado según cualquiera de los aspectos T-6 a T-9, que puede unirse específicamente a canales iónicos tales como, por ejemplo, P2X7 con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) de entre 1 s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} , 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} .
- 45 Aspecto T-11: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-10, que tiene una semivida en suero que es de al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se*, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-22 *per se*, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19 o compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-23 *per se*.
- 50 Aspecto T-12: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-11, que tiene una semivida en suero que se aumenta en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 ó 72 horas, en comparación con la secuencia de inmunoglobulina correspondiente según cualquiera de los aspectos A-1 a A-22, B-1 a B-7, C-1 a C-4, D-1 a D-6, E-1 a E-13, F-1 a F-25 o G-1 *per se*, Nanobody según cualquiera de los aspectos H-1 a H-23 *per se*, polipéptido según cualquiera de los aspectos K-1 a K-19 o compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos L-1 a L-23 *per se*, respectivamente.
- 55 Aspecto T-13: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-12, que tiene una semivida en suero en humano de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más; por ejemplo, al menos 5 días (tal como aproximadamente de 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como aproximadamente de 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como aproximadamente de 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente de 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente de 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente de 14 a 19 días).
- 60 Aspecto T-14: Derivado según cualquiera de los aspectos T-1 a T-13, que es un derivado pegilado.
- 65

Aspecto T-15: Compuesto o constructo, que comprende o consiste esencialmente en uno o más derivados según cualquiera de los aspectos T-1 a T-14, y opcionalmente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más ligadores.

Aspecto T-16: Compuesto o constructo según el aspecto T-15, en el que dichos uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto T-17: Compuesto o constructo según el aspecto T-16, en el que dichos uno o más ligadores, si están presentes, son una o más secuencias de inmunoglobulina.

Aspecto T-18: Ácido nucleico que codifica para un compuesto o constructo según el aspecto T-16 o T-17.

Aspecto T-19: Composición, que comprende al menos un derivado con respecto a cualquiera de los aspectos T-1 a T-14, compuesto o constructo según cualquiera de los aspectos T-15 a T-17, o ácido nucleico o secuencia de nucleótidos según el aspecto T-18.

Aspectos particularmente preferidos de la divulgación

1. Método para la generación de secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por un antígeno asociado a células que comprende las etapas de:

a) vacunación genética de un animal no humano con un ácido nucleico que codifica para dicho antígeno asociado a células o un dominio o parte específica de dicho antígeno asociado a células; y

b) opcionalmente refuerzo del animal con dicho antígeno en su conformación natural seleccionada de 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 antígeno enriquecido, liposomas, o partículas de virus que expresan el antígeno asociado a células

c) examinar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina derivadas de dicho animal no humano para secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a y/o tener afinidad por dicho antígeno asociado a células.

2. El método según el aspecto 1, en el que dicho antígeno asociado a células se selecciona de antígenos transmembrana, que incluye antígenos transmembrana con múltiples dominios de atravesamiento, que incluye pero no se limita a GPCR o canales iónicos.

3. El método según el aspecto 1 ó 2, en el que dicho animal no humano se selecciona de vertebrados tales como escualos, lagarto, y mamíferos, más específicamente camélidos tales como llama y alpaca.

4. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 3, en el que el animal no humano es un camélido o llama.

5. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 4, en el que dichas secuencias de inmunoglobulina son secuencias de dominio variable de cadena ligera, o secuencias de dominio variable de cadena pesada.

6. El método según el aspecto 5, en el que las secuencias de inmunoglobulina son secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

7. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 6, en el que las secuencias de inmunoglobulina son anticuerpos de dominio, o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpos de dominio, anticuerpos de dominio individual, o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpos de dominio individual, "dAb", o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanobodies, que incluyen pero no se limitan a secuencias V_{HH} o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como Nanobodies.

8. El método según el aspecto 7, en el que las secuencias de inmunoglobulina son Nanobodies.

9. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, en el que la vacunación se realiza mediante una inyección de chorro sin aguja, mediante un método balístico, mediante inyecciones mediadas por aguja tales como tatuaje, mediante aplicación tópica o mediante cualquier método de administración de ADN seguido por electroporación *in vivo*.

10. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 9, en el que la vacunación se realiza mediante administración intradérmica, intramuscular o subcutánea de ADN.

11. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 10, en el que el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina se obtiene de la sangre, ganglio linfático, bazo, médula ósea o cualquier tejido que alberga células que codifican para estas secuencias de inmunoglobulina de dicho mamífero no humano.

12. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 11, en el que dicho antígeno asociado a células se expresa en cualquier célula que permite la expresión de la diana en su conformación nativa tal como pero sin limitarse a una célula seleccionada de células Cho, Cos7, Hek293 o derivadas de camélidos tales como célula derivada de llama o derivada de alpaca.

13. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 12, en el que dicho antígeno asociado a células es un antígeno que atraviesa la membrana tal como, por ejemplo, un GPCR y/o canal iónico.

14. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 13, en el que dicho antígeno se selecciona de CXCR7, CXCR4 y/o P2X7.

15. El método según cualquiera de los aspectos 1 a 14, en el que el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina se expresa en un conjunto, colección o muestra de células o virus y dicho conjunto, colección o muestra de células se examina para células que expresan una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tener afinidad por dicho antígeno asociado a células.

16. El método según el aspecto 15, en el que una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tiene afinidad por dicho antígeno asociado a células se purifica y/o se aísla de la célula o virus, seguido por expresión de dicha secuencia de inmunoglobulina.

17. El método según cualquiera de los aspectos 1 a 16, en el que el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina se codifica por un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico y dicho conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácido nucleico se examina para secuencias de ácido nucleico que codifican para una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tiene afinidad por dicho antígeno asociado a células.

18. El método según el aspecto 17, en el que las secuencias de ácido nucleico que codifican para una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tiene afinidad por dicho antígeno asociado a células se purifican y/o se aíslan, seguido por expresión de dicha secuencia de inmunoglobulina.

19. El método según uno cualquiera de los aspectos 1 a 18, en el que la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a y/o tiene afinidad por dicho antígeno asociado a células se purifica y/o se aísla.

20. Inmunoglobulina que puede obtenerse mediante un método de uno cualquiera de los aspectos 1 a 19.

21. Inmunoglobulina dirigida contra un canal iónico que puede obtenerse mediante un método de uno cualquiera de los aspectos 1 a 19.

22. Inmunoglobulina según el aspecto 21, en la que la inmunoglobulina es un antagonista (parcial o total) de un canal iónico.

23. Inmunoglobulina según el aspecto 21, en la que la inmunoglobulina es un agonista (parcial o total) de un canal iónico.

24. Inmunoglobulina dirigida contra P2X7 mediante un método de uno cualquiera de los aspectos 1 a 19.

25. Composición que comprende la secuencia de inmunoglobulina según uno cualquiera del aspecto 20 a 24.

Figuras:

Figura 1.1: Cinética de la respuesta inmunitaria humoral en llama tras vacunación genética con PigJet (panel B) o método de tatuaje (panel C). Los sueros se sometieron a prueba a dilución 1/400. Las flechas indican el momento de inmunizaciones de chorro, los regímenes de intervalo corto de tatuaje se indican mediante asteriscos.

Figura 1.2: Respuesta sérica secundaria intensa observada en llamas vacunadas con ADN después de un único refuerzo de proteína HBsAg.

Figura 1.3. Respuestas inmunitarias humorales obtenidas por medio de protocolo de sensibilización de "ADN" - refuerzo "proteico" (llamas 124, 160, 117, 203) frente a inmunizaciones proteicas (llamas 32 y 33).

Figura 1.4. Respuesta de anticuerpo mediada por anticuerpo de cadena pesada (IgG2 y 3) frente a HBsAg (llama

124).

Figura 2.1. Tinción específica de CXCR4 de células HEK293 tras transfección de pVAX-hCXCR4 y camélido después de transfección de pcDNA3.1-hCXCR4.

Figura 2.2. Conversión sérica específica de CXCR4 en llamas mediante inmunización genética. Panel A: protocolo de sensibilización de “ADN” y refuerzo “celular”; panel B: solamente protocolo de refuerzo “celular”

Figura 2.3. Eficiencia de descubrimiento de Nanobody específica de hCXCR4 a partir de repertorios de “ADN”, “PB” o “célula” (número de bibliotecas).

Figura 2.4. Repertorios de Nanobody específicos de diana complementarios obtenidos después de inmunización genética (ADN) y refuerzo celular individual (PB). Se representan números de familias de Nanobody específicas de repertorio.

Figura 2.5. Potencias de unión promedio determinadas mediante FACS (panel A) o ELISA (panel B) de repertorio de Nanobody específico de CXCR4 después de examen primario identificado después de inmunización genética (“ADN”), posterior refuerzo celular individual (“PB”) o después de inmunización celular completa (“célula”) (número de Nanobodies individuales).

Figura 3.1. Conversión sérica específica de mP2X7 en llamas mediante inmunización genética.

Figura 3.2. Alineación de secuencia de mP2X7 de humano y ratón.

Figura 3.3. Conversión sérica específica de mP2X7 en llamas mediante inmunización con cóctel genético.

Figura 3.4. Sueros inmunitarios adsorbidos previamente contienen anticuerpos de cadena pesada específicos de mP2X7 después de inmunización genética. Panel A: anti-IgG-1 de llama; panel B: anti-IgG-2/3 de llama.

Figura 3.5. Eficiencia de descubrimiento de Nanobody específico de mP2X7 a partir de repertorios de “ADN”, “PB” o “célula” (número de bibliotecas).

Figura 3.6. Diversidad de secuencia de Nanobodies identificada después de examen primario para mP2X7. ADN: inmunización con ADN; PB: inmunización con ADN seguido por refuerzo posterior.

Figura 3.7. Ejemplo representativo de extractos periplásmicos de clones 2C4 y 5A1 con y sin preincubación con anticuerpos anti-Myc para la unión a células Hek293 que expresan mP2X7 y Hek293 de WT (*wild-type*, de tipo natural) de control.

Figura 3.8. Curva de valoración de Nanobodies de 24 familias diferentes para la unión a células mP2X7-Cho.

Figura 3.9. Inhibición dependiente de la dosis mediante Nanobodies de liberación de CD62L inducida por ligando en células Yac-1 que expresan mP2X7.

Figura 3.10. Valoración de nucleótidos en liberación de ectodominio de CD62L mediada por mP2X7 con concentración fija de Nanobodies (2 μ M). Panel A/B - Nanobodies 14D5, 13G9, 7H6, 13B5, sin nb, Art 2.2 nb; panel C/D: 4B4, 7D6, 13A7, 8G11, 8F5, 8G12, sin nb, nb irrelevante, ART2.2 nb.

Figura 3.11. Nanobodies bivalentes de 13A7 (célula), 8G11 (PB) y 14D5 (ADN) muestran potencias intensificadas en función de mP2X7 de bloqueo o intensificación. Panel A/B: Nanobodies o constructos de Nanobody: 8G11, 13A7-35GS-13A7, 13A7, 8G11-35GS-8G11, nb irrelevante; panel C/D: Nanobodies o constructos de Nanobody: 14D5, 14D5-35GS-14D5, nb irrelevante.

Figura 3.12. Potencias de unión promedio determinadas mediante ELISA de repertorio de Nanobody específico de mP2X7 identificado después de inmunización genética (“ADN”), posterior refuerzo celular individual (“PB”) o después de inmunización celular completa (“célula”) (número de Nanobodies únicos).

Figura 3.13. Alineación de secuencia de 84 Nanobodies seleccionados para mP2X7 no redundantes a secuencia de línea germinal humana VH3-23/JH5.

Figura 4.1. Conversión sérica específica de CXCR7 en llamas mediante inmunización genética con pistola génica. Las barras blancas o negras representan los valores de MCF generados en células HEK293 de WT transfectadas o no transfectadas con CXCR7.

Figura 4.2. Eficiencia de descubrimiento de Nanobody específica de CXCR7 a partir de repertorios de “ADN”, “PB” o “célula” (número de bibliotecas).

Figura 4.3. Repertorios de Nanobody específicos de diana complementarios obtenidos después de inmunización genética (ADN) y refuerzo celular individual (PB). Se representan números familias de Nanobody específicas de repertorio.

Ejemplos

Ejemplo 1. Inmunización genética de llamas e identificación de secuencias de inmunoglobulina usando el antígeno de superficie pequeña de la hepatitis B como antígeno modelo

Se identificaron secuencias de inmunoglobulina de camélido específicas de diana tras vacunación con ADN. Se eligió el antígeno de superficie pequeña de la hepatitis B como antígeno modelo, ya que esta proteína se ha usado ampliamente para inducir respuestas inmunitarias humorales en animales tras inmunización genética.

Ejemplo 1.1. Generación y preparación de plásmido para inmunización genética

El vector de expresión eucariota pRc/CMV-Hbs(s) que codifica para el antígeno de superficie pequeña de la hepatitis B (HBsAg) se obtiene de Aldevron. La expresión está bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) constitutivo. La secuencia del constructo resultante se ha verificado mediante análisis de secuencia. El ADN plasmídico se produce usando un kit Gigaprep libre de endotoxinas (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ADN de vector se reconstituye finalmente a una concentración de 1 mg/ml en H₂O de LAL libre de endotoxinas o en NaCl al 0,9% libre de endotoxinas en H₂O de LAL. El plásmido se almacena en alícuotas a -20°C. Antes de su uso, la disolución de ADN plasmídico se centrifuga para retirar posibles agregados.

Ejemplo 1.2. Inducción de una respuesta inmunitaria humoral en camélidos mediante inmunización genética tras métodos distintos de administración de ADN.

Después de la aprobación del Comité ético de la Facultad de medicina veterinaria (Universidad de Gante, Bélgica), se inmunizaron cuatro llamas (124, 160, 117 y 203) usando dos métodos de inmunización genética para inducir una respuesta humoral específica de antígeno. Para ambos métodos, se aplicó ADN por vía intradérmica (ID). El primer método de administración de ADN consistió en inyección de chorro sin aguja, el segundo siguió un método de tatuaje (Bins *et al.* 2005. *Nature Medicine* 11:899-904). Antes de la aplicación del ADN, se afeita una zona de la piel de llama de aproximadamente 200-240 cm² por encima del omóplato, se trata la piel con crema depilatoria comercial (Veet) durante 2 minutos para retirar químicamente todo el pelo remanente y parte del estrato córneo, y la zona afeitada se limpia a fondo enjuagando con agua. Para el primer método, se administra ADN en la piel usando el dispositivo Pigjet (endoscópico) (llamas 124 y 160). Un cabezal de múltiples boquillas permite distribuir la disolución de ADN simultáneamente sobre cinco puntos adyacentes de 0,04 ml cada uno, dejando ampollas o pápulas de inyección en la piel durante un par de horas. Cada dosis (1 mg de ADN) que recibió la llama (días 0, 14, 28 y 57), por tanto, dio como resultado 25 ampollas de inyección. Para el método de tatuaje de intervalo corto, se usó un régimen de intervalo corto. Se anestesiaron las llamas 117 y 203, y la zona de aplicación de ADN se divide en tres partes para tatuar en los días 0, 3, 7 (intervalo 1), 21, 24, 28 (intervalo 2), 56, 59 y 63 (intervalo 3). Se aplican gotitas de un mg/ml de ADN y se tatúan en la piel usando un dispositivo de tatuaje comercial (aguja de producción de calibre 9) a 0,5 mm de profundidad durante al menos 10 minutos por sesión sobre una superficie de aproximadamente 80 cm². La dosis de ADN administrado es de 1,33 mg (intervalo 1 y 2) y 4 mg (intervalo 3). De todas las llamas, se recogieron pequeñas muestras de sangre a intervalos regulares durante la inmunización para monitorizar la conversión sérica mediante ELISA.

Para verificar si las llamas indujeron una respuesta inmunitaria humoral específica de HBsAg después de la vacunación con ADN, se ejecutó un ELISA con una dilución de 400 veces de sueros preinmunitarios e inmunitarios. En resumen, se inmoviliza 1 µg/ml de HBsAg recombinante (Aldevron) durante la noche a 4°C en una placa Maxisorp de 96 pocillos (Nunc). Los pocillos se bloquean con una disolución de caseína (1% en PBS). Después de la adición de la dilución sérica, se detectaron inmunoglobulinas unidas específicamente usando un conjugado de peroxidasa de rábano anticuerpo de cabra anti-IgG de llama (Bethyl Lab. Inc., Montgomery, TX). Los resultados representados en la figura 1.1 demuestran que para el método de inyección de chorro para ambas llamas (124 y 160) se detecta una conversión sérica específica de diana clara (día 0 frente a día 80) aunque con magnitudes variables (figura 1.1 panel A,B). Después del tercer ciclo de tatuado, se demuestra una tendencia similar para la llama 117 y 203, aunque la magnitud de la respuesta es menor en comparación con la inyección de chorro (figura 1.1 panel A,C).

Ejemplo 1.3. Reforzar los camélidos sensibilizados con ADN con proteína HBsAg aumentó la conversión sérica específica de antígeno, incluyendo respuestas mediadas por anticuerpo de cadena pesada.

En el día 85, se administró por vía intramuscular (IM) un refuerzo individual con 50 µg de HBsAg purificada usando Stimune (CEDI Diagnostics, Lelystad, Países Bajos) como adyuvante en el cuello de las cuatro llamas, y se recogieron pequeñas muestras séricas. Se realizó evaluación de la respuesta inmunitaria para los cuatro animales mediante ELISA tal como se describe en el ejemplo anterior y mostró que un único refuerzo de HBsAg indujo una

respuesta secundaria intensa para los cuatro animales (figura 1.2). Siguiendo este enfoque de sensibilización de “ADN” - refuerzo “proteico”, se generaron títulos séricos específicos de antígeno similares en comparación con un método de inmunización donde sólo se ha inyectado proteína HBsAg (llamas 32 y 33; seis inyecciones IM de cuello; dosis de 100-50 µg de proteína/inyección usando Stimune como adyuvante). Los resultados se muestran en la figura 1.3. La respuesta de anticuerpo se preparó mediante los repertorios tanto convencional como de células B que expresan anticuerpos de cadena pesada, ya que se detectaron inmunoglobulinas de llama unidas con anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los anticuerpos convencionales IgG1 de llama o los anticuerpos IgG2 e IgG3 de llama sólo de cadena pesada (figura 1.4) (Daley *et al.*, Clin Diagn Lab Immunol. Marzo de 2005;12(3):380-6).

Ejemplo 1.4. Sensibilizar la respuesta inmunitaria en camélidos frente a HBsAg con ADN es suficiente para identificar Nanobodies específicos de antígeno madurados *in vivo*.

Se recogieron muestras de sangre de 150 ml que contenían células B de la llama 124 y 117 (las llamas que mostraban conversión sérica más alta tras aplicación de PigJet y ADN de tatuaje, respectivamente) entre la última administración de ADN y el refuerzo proteico de HBsAg. Posteriormente, se purificaron linfocitos de sangre periférica (PBL) mediante una centrifugación por gradiente de densidad en Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Se extrajo el ARN total y se preparó ADNc para amplificar el repertorio de Nanobody mediante PCR anidada tal como se describió previamente (por ejemplo, documentos WO 02/085945 y WO 04/049794). Los productos de PCR se digirieron con *SfiI* (introducido mediante PCR anidada en la región de cebador FR1) y *BstEII* (sitio de restricción que se produce de manera natural en FR4) y tras electroforesis en gel, se purificó el fragmento de ADN de aproximadamente 350 pb a partir del gel. Se ligaron 330 ng de repertorio de Nanobody amplificado en los sitios de restricción correspondientes de un µg de vector de presentación de fago digerido con *SfiI*-*BstEII* (pAX50) para obtener una biblioteca después de la electroporación de TG1 de *Escherichia coli*. El pAX50 contiene el promotor LacZ, una secuencia que codifica para proteína pIII de colifago, un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple (que alberga los sitios de restricción de *SfiI* y *BstEII*) y una secuencia líder quimérica que consiste en motivos de gen 3 y *peIB* de *Erwinia carotovora*. Este vector de presentación permite la producción de partículas de fago, que expresan los Nanobodies individuales como proteína de fusión con un c-Myc, una etiqueta de His6 y con el producto génico III. El tamaño de las bibliotecas derivadas de tejidos inmunitarios de llama 124 y 117 era de 1×10^8 y 3×10^7 UFC respectivamente. Como control de calidad de biblioteca, se determinó el porcentaje de inserto de tamaño correcto como el 91 y el 100%, respectivamente, mediante una PCR de colonia usando el inverso de M13 y un cebador génico III en 24 colonias escogidas aleatoriamente de cada biblioteca.

Se rescataron bibliotecas haciendo crecer las bacterias hasta una fase logarítmica ($DO_{600} = 0,5$), seguido por infección con fago auxiliar para obtener fago recombinante que expresa el repertorio de Nanobodies clonados en el extremo del fago como proteína de fusión pIII. El fago se almacenó después de esterilización con filtro a 4°C para su uso adicional.

Se seleccionaron Nanobodies específicos de HBsAg después de una sola ronda de cribado tal como sigue. Se inmovilizó directamente HBsAg recombinante (Aldevron) sobre placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania) a 500 y 50 ng por pocillo. Después de incubación de 2 horas con las bibliotecas de fago y lavado extensivo, se eluyó el fago unido con tripsina (1 mg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se inhibió la actividad de proteasa añadiendo 5 ml de inhibidor de proteasa ABSF 16 mM al los 100 ml de eluato de fago. En todas las condiciones de selección, se observó un mayor número de fago eluido a partir de un pocillo de HBsAg inmovilizada cuando se comparaba con el número de fago eluido a partir de un pocillo no recubierto con HBsAg, que indica un enriquecimiento en Nanobodies específicos de HBsAg. El producto de cada selección se re infectó en TG1 de *E. coli* hecho crecer logarítmicamente durante 30 minutos a 37°C y se hicieron crecer diluciones apropiadas durante la noche en medio sólido (LB que contiene glucosa y ampicilina al 2%) para obtener colonias únicas. Se escogieron colonias individuales a partir de productos de selección enriquecidos en HBsAg y hechos crecer en placas de 96 pocillos profundos (1 ml de volumen) y se indujeron añadiendo IPTG para la expresión de Nanobody. Se prepararon extractos periplásmicos (PE) en un volumen de 80 µl según métodos convencionales. En total se examinaron diluciones de 10 veces de 188 PE (94 para llama 124 y 94 para llama 117 de PE derivados) para la unión específica a HBsAg recubierto en fase sólida mediante ELISA, usando anticuerpo monoclonal anti-Myc de ratón y posterior etapa de detección de anticuerpos conjugados de anti-HRP de ratón. Los extractos periplásmicos que mostraban señal mínima de 2 veces por encima del fondo (pocillo no recubierto) se puntuaron como positivos y se secuenciaron clones de Nanobody correspondientes. Para las bibliotecas 124 y 117, puntuaron positivo el 68% y el 4% de los clones, respectivamente. Tras el análisis de secuencia, se identificaron 5 familias de Nanobody específicas de HBsAg (3 de llama 124 y 2 de llama 117; SEQ ID de la tabla 1.1) con ejemplos de familias representativas HBSAGPMP2E7 (familia 1), HBSAGPMP2E12 (familia 2) y HBSAGPMP2A4 (familia 3) de llama 124 y HBSAGPMP1 C6 (familia 4) y HBSAGPMP1E11 (familia 5) de llama 117.

Ejemplo 1.5. Nanobodies aislados de llamas vacunadas con ADN muestran velocidades de disociación similares a las identificadas de llamas inmunizadas con proteína.

Se inmovilizaron partículas de HBsAg derivadas de plasma (Biodesign) sobre chips sensores CM5 de resonancia de

plasmón superficial (BIAcore) a una densidad de 11000 RU. Se realizó la regeneración de la superficie de chip con un flujo de cinco segundos de HCl 0,1 M a una velocidad de flujo de 45 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. Se inyectaron los extractos periplásmicos de Nanobody para evaluar las velocidades de disociación (Biacore). Se hizo referencia doblemente a los datos mediante la resta de las curvas en el canal de referencia y de una inyección de tampón que ejecuta el blanco. Se evaluaron las curvas procesadas ajustando un modelo de disociación 1:1 sobre las curvas de unión en el software Biacore T100 Evaluation v1.1.1 y el software Biaevaluation v4.1. Se calcularon velocidades de disociación de HBSAGPMP2E7, HBSAGPMP2E12 como $8,8\text{E}-4 \text{ s}^{-1}$ y $1,3\text{E}-3 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Estas velocidades de disociación eran similares a las obtenidas para los Nanobodies específicos de HBsAg identificados después de selección en bibliotecas obtenidas de la llama 32 y 33 (velocidades de disociación de entre $6,0\text{E}-2$ y $1,7\text{E}-3 \text{ s}^{-1}$) (Serruys *et al.* 2009 Hepatology 49(1):39-49), que indican que las afinidades de los Nanobodies obtenidos mediante inmunización genética no difieren de los Nanobodies identificados mediante inmunización proteica.

Tabla 1.1: Secuencias:

Nombre	SEQ IDN NO:	Secuencia de inmunoglobulina
PHbsAgPMP2E7	700	EVQLVESGGGLLQAGGSLRLSCAASERAFIYG KAWFRQAPGKEREFEVAGINWNGGDLHYADSVK GRFTISRDNNTNNVYVLQMNSLKSEDTAVYYCAV RRGTAYETDVSSYEWGTQVTVSS
PHbsAgPMP2E12	701	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSISEYA MGWFRQAPGQEREFEVASISTSGGSTTYADSVK GRFIISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAR YNGWMYYAGTMGVHFGQGTQVTVSS
PHbsAgPMP2A4	702	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIDSINR MGWYRQAPGKQRELVASSTSGGSTDYADSVK GRFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCNF RGSYYSGYGDYWGKGLTVTVSS
PHbsAgPMP1C6	703	KVQLVESGGGWVRTGGSMRLSCAASGRTSSG SAMGWFRQAPGKERVFVAASWGGAYTDYADS VKGRFTISRDNWRNTVDLQMNNLKPEDTAVYY CADGGSTWYEPTESDFGSWGQGTQVTVSS
PHbsAgPMP1E11	704	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSRDLN VMGWYRQAPGKERDLVATMTAGGSTNYADSV KGRFTISRDIANMVYVLQMNSLKPEDTAVYYCNGI TASWYSGSYNNYWGQGTQVTVSS

Ejemplo 2. Identificación de Nanobodies contra receptores acoplados a proteína G mediante inmunización genética.

Con el fin de demostrar la viabilidad de la inmunización genética para dianas unidas a membrana que portan múltiples dominios transmembrana, se eligió como primer ejemplo el receptor CXCR4 de quimiocina humano.

Ejemplo 2.1. Generación de un vector que codifica para CXCR4 adecuado para inmunización genética.

Se adquirió el receptor CXCR4 de quimiocina humano que codifica para ADNc (NM_003467) de Open Biosystems. Después de la introducción mediada por PCR de sitios de restricción NheI (extremo 5') y XhoI (extremo 3'), se clonó el amplicón en los sitios correspondientes de pVAX-1 (Invitrogen) y pcDNA3.1 (Invitrogen). La integridad de secuencia de los pVAX1-CXCR4 y pcDNA3.1-CXCR4 resultantes se verificó mediante análisis de secuencia. El vector pVAX1 se diseñó para usarse para inmunización genética, y alberga el promotor de citomegalovirus (CMV) humano. El pVAX1 permite replicación de alto número de copias en *E. coli*, alto nivel de expresión transitorio de la proteína de interés en la mayoría de células de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo*. Se produjeron cantidades en miligramos de plásmido de pVAX1-CXCR4 libre de endotoxinas, se disolvieron hasta una concentración de 2 mg/ml en solución salina al 0,9% en H_2O de LAL y se almacenaron a -20°C .

Ejemplo 2.2. Las células transfectadas con pVAX1-CXCR4 expresan receptor de CXCR4 funcional.

Para verificar la expresión funcional de CXCR4 humano, el plásmido de pVAX1-CXCR4 libre de endotoxinas se transfectó de manera transitoria en células HEK293 usando Eugene (Roche) para monitorizar la expresión extracelular *in vitro* mediante citometría de flujo. Como anticuerpos de detección se usaron anticuerpo monoclonal específico de CXCR4 humano 12G5 (R&D Systems MAB170) seguido por anticuerpo que detecta IgG anti-ratón de cabra marcado con PE (Jackson ImmunoResearch Inc. Cat. n.º 115-115-164). Siguiendo este método, se mostró un desplazamiento de intensidad de fluorescencia de 38 veces de las pVAX1-hCXCR4/HEK293 transfectadas sobre células HEK293 no transfectadas (figura 2.1, panel A). La presencia de CXCR4 funcional en la superficie celular se confirmó mediante la unión de su ligando CXCL12/SDF-1a biotinilado (R&D Systems, kit de fluorocina alfa biotinilada CXCL12/SDF-1 humana NNS00) a HEK293 transfectadas con CXCR4 pero no células HEK293 parentales, siguiendo el procedimiento del fabricante (no mostrado).

Ejemplo 2.3. Generación de células de camélido de CXCR4 transfectadas de manera estable.

Para la generación de líneas celulares de CXCR4 estables, se transfectó el plásmido pcDNA3.1-hCXCR4 en células renales de camello immortalizadas (CAKI) (Nguyen *et al.* 2001. Adv. Immunol. 79: 261-296). Se clonaron células transfectadas individuales que mostraban alta densidad de expresión indicada mediante tinción fluorescente con el anticuerpo 12G5 (tal como se describe en el ejemplo 2.2) mediante deposición de células individuales en pocillos de placa de microtitulación (FACSARIA I con ACUDU, Becton Dickinson). Después del resultado de líneas celulares clónicas en medio que contenía selección de antibióticos y confirmación de expresión de CXCR4 mediante citometría de flujo (tal como en el ejemplo 2.2), se obtuvieron múltiples transfectantes en CAKI de CXCR4 estables homogéneos. Un clon que mostraba un desplazamiento de fluorescencia de 114 veces sobre las células de camélido no transfectadas, que indicaba altos niveles de expresión de membrana de CXCR4, se seleccionó para experimentos adicionales (figura 2.1, panel B).

Ejemplo 2.4. La administración intradérmica de pVAX1-CXCR4 es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria humoral específica de diana detectable en llama.

Después de la aprobación del Comité ético de la Facultad de medicina veterinaria, Universidad de Gante, Bélgica, se asignaron cuatro llamas (llama 389, 401, 402 y 403) para inmunización genética. Inmediatamente antes de la administración del ADN que codifica para CXCR4, se afeitó una zona de piel de 250 cm² que cubre el omóplato de llama y se retiró todo el tejido capilar restante mediante la aplicación de crema depilatoria comercial tal como se describe en el ejemplo 1.2. Se administró ADN disuelto en solución salina al 0,9% en la piel sin pelo mediante inyección de chorro sin aguja usando el Dermojet automático denominado Vacci-jet (Akra DermoJet Francia) usando un cabezal de 3 boquillas. Para las cuatro administraciones de ADN (día 0, 14, 28 y 42), se aplicaron dos mg de ADN por llama, distribuidos sobre múltiples puntos adyacentes. La aplicación intradérmica (ID) satisfactoria del líquido que contiene ADN se indica mediante la formación de ampollas o pápulas que contienen líquido superficiales en la piel durante un par de horas. De cada llama, se recogieron una muestra sérica de 10 ml preinmunitaria y distintas muestras séricas durante el procedimiento de vacunación genética para monitorizar la respuesta humoral específica de antígeno. La unión de inmunoglobulinas de llama presentes en las muestras preinmunitarias diluidas de 250 a 5000 veces (día 0) y muestra sérica inmunitaria (día 53; recogida 11 días después de la cuarta aplicación de ADN) se puntuaron para tinción diferencial de camélido transfectado con CXCR4 frente a células de camélido no transfectadas mediante citometría de flujo. La detección de IgG total de llama unida a células (anticuerpo convencional + de cadena pesada) se detectó mediante anticuerpo de cabra anti-IgG de llama (n.º de cat A160-100; Bethyl) seguido por tinción secundaria con anticuerpo anti-IgG de cabra de asno conjugada con PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories n.º de cat 115-115-164). Excepto para la llama 403, se observó un claro aumento en la fluorescencia celular media (MCF) para todos los sueros inmunitarios de día 53 en células CAKI transfectadas con CXCR4 en comparación con el nivel preinmunitario (para tres diluciones sometidas a prueba como mínimo), mientras que los valores de MCF de células CAKI no transfectadas teñidas de manera similar permanecieron bajos (figura 2.2). Esto indicó que tras inmunizaciones genéticas ID, 3 de cada 4 llamas mostraron una respuesta humoral específica frente a la conformación de diana nativa.

Ejemplo 2.5. La inmunización genética seguida por un refuerzo celular individual aumenta significativamente la conversión sérica específica de CXCR4.

Se eligieron células de camélido como los fondos celulares inmunogénicos para dirigir la respuesta inmunitaria hacia CXCR4, anticipando la inmunogenicidad reducida de marcadores de superficie celular de camélido en llama debido a la alta similitud de secuencia global, en comparación con fondos celulares de huéspedes roedores o humanos. Se recogieron células de camélido que expresan CXCR4 cultivadas (ejemplo 2.3) recientes y se lavaron dos veces con D-PBS para retirar todos los contaminantes del medio de cultivo. Se resuspendieron las células en 2 ml de D-PBS y se almacenaron en hielo durante la transferencia a las instalaciones de animales. Se les inyectó a las llamas 389, 401, 402 y 403 por vía subcutánea (SC) células de camélido transfectadas con 2E7 hCXCR4, como mínimo tres semanas después de la administración de ADN final. Once días después del refuerzo celular, se recogió una muestra de sangre inmunitaria de cada llama y se determinó el título sérico de CXCR4 tal como se describe en el ejemplo 2.4. Para las cuatro llamas (a diluciones séricas de 250 a 2250 veces), se detectaron valores de MCF aumentados en células de camélido transfectadas con CXCR4 en comparación con muestra sérica obtenida después de administración de ADN solo (día 53), mientras que la unión sérica a células de camélido no

transfectadas sólo se aumentó ligeramente en tres animales. Estos resultados indican que el refuerzo celular individual dio como resultado una magnitud de respuesta de CXCR4 aumentada para las cuatro llamas (figura 2.2 y tabla 2.1). En paralelo a las cuatro llamas genéticamente inmunizadas, se determinó el título sérico en muestras de día 62 recogidas de llamas 217 y 218 (figura 2.2 y tabla 2.1). Estas llamas se inmunizaron con seis inyecciones de células CXCR4-HEK293 (1-4E7 células por dosis) a intervalos semanales (descrito en la patente WO/2009/138519A1). Solo una de las dos llamas (218) mostró una respuesta sérica intensa a células que expresan CXCR4 en comparación con las células de control no transfectadas (n = 2; un ejemplo representativo mostrado). Los valores de MCF detectados indicaron que el procedimiento de inmunización genética ejecutado (ADN + refuerzo celular) genera una magnitud de título específico de diana similar o mejor en comparación con una inmunización celular total.

Tabla 2.1. Visión general de descubrimiento de linajes de células B de Nanobody específico de CXCR4.

ID de llama	Inmunógeno	Respuesta de CXCR4 (FACS)	Biblioteca	Condiciones de selección	Tasa de acierto de examen de especificidad (ELISA)	Número de familias de Nanobody específicas de CXCR4 (algunas de las cuales son ligando de desplazamiento)
389	ADN	+	ADN	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	18% (8/45) 9% (4/45) 13% (6/45)	5
	células de camélido/hCXCR4	++	PB	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	4% (2/45) 76% (34/45) 78% (35/45)	3
401	ADN	+	ADN	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	0% (0/45) 2% (1/45) 4% (2/45)	3
	células de camélido/hCXCR4	++	PB	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	22% (10/45) 89% (40/45) 76% (34/45)	3
402	ADN	+	ADN	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	0% (0/45) 16% (7/45) 7% (3/45)	4
	células de camélido/hCXCR4	++	PB	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	36% (16/45) 67% (30/45) 67% (30/45)	22
403	ADN	-	ADN	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	4% (2/45) 31% (14/45) 27% (12/45)	6
	células de camélido/hCXCR4	+	PB	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	7% (3/45) 51% (23/45) 44% (20/45)	4
217	células hCXCR4/Hek2 93	+	Células	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	4% (2/45) 89% (40/45) 78% (35/45)	10
218	células hCXCR4/Hek2 93	+	Células	R1: 10U R2: 10U R2: 1U	7% (3/45) 93% (42/45) 96% (43/45)	15

Ejemplo 2.6. La inmunización genética es suficiente para identificar Nanobodies específicos de CXCR4.

Se recogieron cuatro muestras de sangre de 150 ml de las llamas 389, 401, 402, 403, 3 y 9 días tras la última administración de ADN (codificadas PBL1 y PBL2, respectivamente) y 4 y 8 días después del refuerzo celular (PBL3 y PBL4, respectivamente). Además, se recogió una biopsia del ganglio linfático (LN) palpable en arco de cada llama mediante cirugía local de tres a cuatro días después del refuerzo celular. Se purificaron linfocitos de sangre periférica de muestras PBL1-4 mediante centrifugación por gradiente de densidad en Ficoll-Paque tal como se describe en el ejemplo 1.4. Se extrajo ARN total de todos los tejidos inmunitarios que albergan linfocitos y se usó como molde para preparar ADNc (tal como se describe en el ejemplo 1.4). Para cada llama inmunizada genéticamente, se generaron 2 bibliotecas independientes (tabla 2.2): una biblioteca derivada de PBL1+2 ADNc agrupados (biblioteca de "ADN") y una segunda derivada de PBL3+4 y LN agrupados (posterior a refuerzo o biblioteca de "PB").

Tabla 2.2. Distancia genética de cinco familias de Nanobody de CXCR4 madurado *in vivo* frente a secuencias de línea germinal V parental.

Familia de Nanobody	Familia de Nanobody originada a partir de llama	Biblioteca (número de variantes de Nanobody)	Potencia de interacción con diana promedio (razón de MCF; FACS)	Potencia de interacción con diana promedio (razón de absorción; ELISA)	Número promedio de mutaciones nt frente a línea germinal V parental ¹	Número promedio de mutaciones AA frente a línea germinal V parental ¹
A	389	ADN (1)	46	14	19	10
		PB (16)	553	33	26	12
B	389	ADN (1)	105	7	17	12
		PB (3)	261	11	19	13
C	389	ADN (2)	505	43,5	5,5	5
		PB (6)	556	87,3	13	9
D	402	ADN (1)	755	56	21	15
		PB (7)	671	73	22	14,6
E	403	ADN (2)	381	20,5	17	10,5
		PB (2)	412	10,5	18	11,5

5 ¹Cualquier cambio, incluyendo una delección o una adición se considera para calcular el número de mutaciones.

Aunque las respuestas séricas policlonales detectadas mediante citometría de flujo indican la presencia de anticuerpos de llama específicos de diana contra CXCR4 nativos, la magnitud del título no es necesariamente predictiva para i) la diversidad clonal mediada por anticuerpo de cadena pesada anti-CXCR4, ii) la afinidad de Nanobodies monoclonales por la diana y iii) del ancho de respuesta, por ejemplo los epítomos de CXCR4 cubiertos por los Nanobodies individuales. Se identificaron Nanobodies específicos de CXCR4 mediante presentación de fago con el fin de caracterizarlos en un nivel monoclonal. Se realizaron selecciones paralelas en cada una de las ocho bibliotecas de ADN y PB, y en dos bibliotecas adicionales generadas a partir de llamas inmunizadas con células. Se generaron bibliotecas de manera similar a partir de ADNc agrupado derivado de PBL1+2, recogido 4 y 8 días después de la inyección celular final.

Para seleccionar Nanobodies específicos de CXCR4, se rescató fago recombinante de las diez bibliotecas tal como se describe en el ejemplo 1.4. En una primera ronda de selección, se bloquearon 10 unidades de vesículas de membrana inmovilizadas en placa de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) derivadas de células HEK293 transfectadas con CXCR4 con leche en polvo baja en grasa (Marvell 4% en PBS). Después de 2 horas de incubación con fago rescatado, se permitió elución con tripsina (1 mg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente posterior a 15 lavados con PBS. Inmediatamente, se neutralizó la actividad de proteasa aplicando inhibidor de proteasa ABSF 0,8 mM. Todos los productos de fago se infectaron en células TG1 de *E. coli* con crecimiento logarítmico y se sembraron en placas de agar (LB + Amp + glucosa al 2%) para análisis de clones de Nanobody individuales. Se rescataron los productos de fago de ronda 1 y se realizó una segunda ronda de selección en 10 ó 1 unidades de vesículas de membrana de CXCR4 inmovilizadas en placa. Se calculó el enriquecimiento como la razón entre el número de fago eluido de vesículas de membrana de CXCR4 frente a los eluidos de vesículas de membrana de control de HEK293 no transfectadas. Para 8 de las 10 bibliotecas, los productos de la ronda dos mostraron enriquecimientos > 5 (datos no mostrados). Los productos de fago de la ronda dos seleccionados en 10 ó 1 unidades de vesículas de membrana de CXCR4 inmovilizadas en placa se infectaron en células TG1 y se sembraron en placas de agar (LB + Amp + glucosa al 2%). Se hicieron crecer cuarenta y cinco clones individuales de cada producto seleccionado en vesículas de membrana de CXCR4 (ronda 1 y ronda 2) en placas de 96 pocillos profundos de 1 ml y se prepararon extractos periplásmicos (PE) tal como se describe en el ejemplo 1.4.

Se determinó la especificidad de CXCR4 mediante dos ensayos de examen usando dos formatos de receptor diferentes. En un primer método, se inmovilizaron dos unidades de vesículas de membrana de CXCR4 por pocillo en placas Maxisorp de 96 pocillos mediante recubrimiento durante la noche a 4°C. Tras bloqueo con el 4% de Marvel en PBS, se añadió PE diluido 10 veces y se detectó Nanobody unido (que alberga una etiqueta de c-Myc) mediante detección secuencial de anti-Myc de ratón y anti-HRP de ratón de conejo. Se consideró que 501 Nanobodies, que mostraban una señal de ELISA aumentada como mínimo 5 veces en vesículas de membrana de hCXCR4 sobre las vesículas de membrana de control, eran específicos de CXCR4. Las razones promedio correspondientes de los dos tipos de PE de control negativo, uno generado a partir de TG-1 que expresa un Nanobody irrelevante y otro a partir de TG-1 que contiene un vector de expresión vacío, eran de $1,1 \pm 0,8$ y $1,2 \pm 0,7$, respectivamente. Como resultado de este método de examen, se calcularon tasas de acierto para cada producto de selección y se resumen en la tabla 2.1. Basándose en las tasas de acierto promedio en los productos de selección de ronda 2 (vesículas de membrana 10U) tras las diferentes estrategias de inmunización, se calcularon las eficiencias de descubrimiento como el 14, el 71 y el 91% para repertorios de "ADN", "PB" y "célula", respectivamente (figura 2.3). Incluso en ausencia de un título de anticuerpo de cadena pesada (HcAb) detectable para CXCR4 (tabla 2.1), se identificaron Nanobodies específicos de diana, tal como indican las tasas de acierto del 4 al 31% después de una y dos rondas de selección en biblioteca de ADN de llama 403, respectivamente. Las tasas de acierto indican que después del refuerzo celular individual, una única ronda de selección era suficiente para identificar Nanobodies específicos de CXCR4 de todos los repertorios de llama de HcAb (tasas de acierto en la tabla 2.1 entre el 4 y el 36%).

Se secuenciaron los 501 Nanobodies específicos de CXCR4 y se retiraron los Nanobodies redundantes (idéntica secuencia de AA). Esto dio como resultado la identificación de 171 secuencias únicas, que pertenecían a 70 distintos linajes de células B de Nanobody (tabla 2.1). Los Nanobodies pertenecen al mismo linaje o familia de células B cuando su región de CDR3 muestra alta similitud de secuencia de aminoácidos y son de la misma longitud. El CDR3 se anticipa para contribuir en su mayor parte a la interacción con antígeno y en consecuencia se asume que Nanobodies que pertenecen a la misma familia se unen al mismo epítipo. El número promedio de familias de Nanobody específicas de CXCR4 identificadas por llama es de 12,5 después de inmunizaciones celulares (217, 218) y de 11,2 mediante inmunización con ADN (ADN+refuerzo celular; 389, 401, 402 y 403), respectivamente. El número de variantes de secuencia de aminoácidos de Nanobody (como mínimo mutación de 1 residuo de AA) que pertenecen a una familia de Nanobody estaba en el intervalo de 1 a como máximo 17 variantes de familia.

La unión específica de CXCR4 se confirmó en un ensayo de examen secundario que medía la unión de Nanobody a células que expresan CXCR4 humano mediante citometría de flujo. A este fin, se incubaron PE diluidos cinco veces con células parentales o de camélido transfectadas con CXCR4 (2×10^5 células) y se midió la unión a Nanobody mediante anti-Myc de ratón (Serotec MCA2200) y posteriores anticuerpos de detección anti-IgG-PE de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories 115-115-164). Para todas las muestras, se calculó la razón del valor de MCF en células que expresan CXCR-4 con respecto a la MCF en células de control no transfectadas. Mientras que un Nanobody irrelevante mostró sistemáticamente una razón < 2,4, se detectó una razón > 10 para 61 familias de

Nanobody (al menos un miembro de la familia), confirmando así la especificidad de estas familias para CXCR4 nativo. De las nueve familias de Nanobody restantes, siete familias que consistían en un solo miembro (7 familias) mostraron una razón < 3, a pesar de razones de absorbancia de 5-10 veces medidas en ELISA en vesículas de membrana. Para las dos familias restantes de Nanobody (2 familias; todas familias de un único miembro) las razones de absorbancia (ELISA) eran de 144 y 70, respectivamente, mientras que las razones de MCF (FACS) eran de 2,2 y 2,3, respectivamente.

Ejemplo 2.7. La administración intradérmica de ADN como método de inmunización es suficiente para identificar Nanobodies que modulan la interacción de receptor de SDF-1-CXCR4.

Posterior al examen para la especificidad de CXCR4 (determinada mediante ELISA o FACS), se sometieron a prueba las 171 variantes de Nanobody específicas de CXCR4 para determinar su capacidad de bloquear la interacción del ligando SDF-1 con su receptor para identificar Nanobodies que modulan la función de receptor (tal como se describe en la patente WO/2009/138519A1). En resumen, se dejó que 40 pM de ligando [¹²⁵I] SDF-1 (marcado propio) se unieran a 2 µg de extractos de membrana de hCXCR4/HEK293 en presencia o ausencia de dilución de diez veces de competidor de Nanobody de un PE (producido tal como se describe en el ejemplo 1.4). Después de incubación durante 1 hora a 4°C, se lavaron los extractos de membrana y se determinó la cantidad total de cuentas por minuto (cpm) radiactivas de ligando unido. Se determinó la unión inespecífica del ligando radiomarcado a los extractos de membrana (no relacionada con CXCR4) mediante adición de SDF-1 sin marcar en exceso (100 nM) para competir todos los radioligandos del receptor de CXCR4. Se restó el valor de unión inespecífica para cada placa de la unión total (cpm en ausencia de NB) y los valores de cpm obtenidos para cada Nanobody, y se calculó el % de unión de [¹²⁵I] SDF-1 residual (SDF_{res}) en presencia de Nanobody. Se identificaron varias familias de Nanobody puntuadas como desplazador de ligando (tabla 2.1), mostrando que se identificaron Nanobodies que compiten con ligandos de cada estrategia de inmunización (representando los repertorios ADN, PB y célula).

Ejemplo 2.8. Mapeo de epítomos de Nanobodies identificados después de las diferentes estrategias de inmunización.

Se volverá a clonar una selección de Nanobodies específicos de diana (competidores y aglutinantes) de cada estrategia de inmunización en un vector de expresión que permite la expresión y purificación de Nanobody soluble fusionado a una etiqueta de His6 y Myc para caracterización adicional. La expresión se producirá en *E. coli* después de inducción de IPTG a 37°C. Después de centrifugar los cultivos celulares, se prepararán extractos periplásmicos mediante congelación-descongelación de los sedimentos y resuspensión en dPBS. Estos extractos se usan como material de partida para cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). Se eluirán los Nanobodies de la columna usando imidazol 250 mM y posteriormente desalados hacia dPBS. Se verificará la pureza e integridad de todos los Nanobodies mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mientras que se verificará la presencia de etiquetas mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Para determinar si los resultados de la estrategia de vacunación con ADN (ADN sólo o seguido por refuerzo celular) en la identificación de Nanobodies contra diferentes epítomos en comparación con los Nanobodies identificados después de la estrategia de inmunización celular, se implementarán varios ensayos de unión de epítomo. Estos son: unión al péptido N-terminal de CXCR4 que corresponde a los residuos de AA 1-14 (ELISA), unión a receptores mutantes de CXCR4 en los que se han introducido mutaciones puntuales en el extremo N-terminal y las regiones de bucle extracelular, o unión a CXCR4 mutados tal como receptor de hCXCR4 truncado en el extremo N-terminal o quimeras de CXCR4 en las que el extremo N-terminal o bucles extracelulares se han reemplazado individualmente por la secuencia de una GPCR relacionada. Alternativamente, se realizará el mapeo de epítomos usando experimentos de competición del panel de Nanobodies purificados con distintos compuestos, específicos de CXCR4 que incluyen i) anticuerpos monoclonales o fragmentos Fab de los que se ha descrito el epítomo (Carnec *et al.* 2005, J. Vir. 1930-33) tal como 4G10 (Santa Cruz, SC53534) que se une al extremo N-terminal lineal, ii) inhibidores de moléculas pequeñas, tales como el antagonista AMD3100 (Sigma A5602), y iii) otros Nanobodies marcados con un marcador fluorescente o biotina.

Ejemplo 2.9. El refuerzo celular tras inmunización genética genera un repertorio de Nanobody diferente.

Se identificaron 45 familias de Nanobody específicas de CXCR4 de las llamas 389, 401, 402 y 403, que consistían en 123 variantes de secuencia de Nanobody (de 225 secuenciadas). Cada una de estas 123 variantes se asignó a las bibliotecas de "ADN" o a la biblioteca de "PB" (no se obtuvo variante con secuencia de AA idéntica de ambas bibliotecas). Sólo para cinco de estas 45 familias (el 11,1% de la diversidad de familias total), se identificaron variantes de Nanobody que pertenecen a la misma familia de las bibliotecas de "ADN" y "PB" derivadas del mismo animal (tabla 2.2). Estas cinco familias comprenden 42 variantes de Nanobody diferentes, que corresponden al 34% de los clones no redundantes. El repertorio restante de Nanobody (76%) se identifica o bien de la biblioteca de "ADN" o bien de la biblioteca de "PB" indicando que el refuerzo celular tras la inmunización genética produjo maduración *in vivo* de un repertorio de Nanobody no identificado fácilmente mediante cribado de una biblioteca generada después de sólo inmunización genética (figura 2.4). La inmunización genética sólo da como resultado un diferente repertorio de Nanobody, indicando que puede perderse el repertorio después del refuerzo celular.

Ejemplo 2.10. La potencia promedio del repertorio de “ADN” es menor que la del repertorio de “PB” y “célula”.

El ejemplo anterior indica que sólo se ha identificado un número de familias limitado de las bibliotecas tanto de “ADN” como de “PB”. Con el fin de verificar cuál es el efecto del refuerzo celular para este subconjunto de repertorio, se puntuó la maduración *in vivo* i) calculando la distancia genética frente a la secuencia de línea germinal de gen V parental (en número de mutaciones de aminoácido o nucleótido; excluyendo los segmentos de gen D y J que codifican para la región CDR3 y FR4) para cada variante dentro de la familia de Nanobody específica y ii) comparando potencias de variantes de Nanobody. Para el cálculo de la distancia genética, se asumió una introducción proporcional de errores de amplificación para todas las bibliotecas (se ha usado una polimerasa de corrección de errores para limitar el número de mutaciones producidas por el método de clonación de repertorio de Nanobody incluyendo amplificación mediante PCR). Para tres de estas cinco familias, los Nanobodies que se originan de “PB” mostraron en promedio 12, 13 y 9 mutaciones de AA (o 26, 19 y 13 mutaciones de nt) frente a la secuencia de línea germinal de gen V parental, mientras que respectivamente 10, 12 y 5 (o 19, 17 y 5,5 en el nivel de nt) para los Nanobodies derivados de la biblioteca de “ADN”, lo que sugiere que en promedio los nanobodies que se originan de “PB” están más distantes de la línea germinal de gen V parental (por tanto, más maduros) que los Nanobodies que se originan de “ADN”. Para estas tres familias, el mayor grado de maduración de los Nanobodies de “PB” también se refleja en la potencia de unión promedio (razón de MCF tal como se describe en el ejemplo 2,6) de los Nanobodies que se originan de “PB” frente a de “ADN” que son respectivamente 553 frente a 46, 261 frente a 105, 556 frente a 505 para 3 familias respectivamente (resultados de FACS pero se confirma la tendencia en ELISA, véase la tabla 2.2).

Cuando se analiza la unión a diana dependiente de concentración para los 122 Nanobodies únicos de llama 389, 401, 402 y 403 (20 y 102 variantes de Nanobody que se originan respectivamente a partir de las bibliotecas de “ADN” y “PB”), las razones de MCF promedio (FACS) eran de 427 y 196 para los Nanobodies que se originan a partir de bibliotecas de “PB” y “ADN”, respectivamente (figura 2.5). La cifra correspondiente calculada a partir de las 49 variantes de Nanobody que se originan a partir de bibliotecas de “célula” (llamas 217 ó 218) es de 538. Esta tendencia se confirma mediante las cifras generadas mediante el ensayo de ELISA: las razones de adsorción promedio (calculadas tal como se describe en el ejemplo 2.6) eran de 36,2 y 23 para los Nanobodies que se originan a partir de bibliotecas de “PB” y “ADN”, respectivamente. La cifra correspondiente calculada a partir de las 49 variantes de Nanobody que se originan a partir de bibliotecas de “célula” (llamas 217 ó 218) es de 28. Esto sugiere que la distancia genética promedio de las variantes de Nanobody que se originan a partir de las bibliotecas de “ADN” están relacionadas más estrechamente con la secuencia de línea germinal parental que los Nanobodies identificados a partir de bibliotecas de “PB”, consideradas por tanto como que son menos maduras. Además, cuando se analizan las potencias de unión promedio de los tres repertorios, el repertorio de “ADN” parece menos potente que el repertorio de “PB”, siendo el último potente de manera similar al repertorio de “célula” (figura 2.5).

Sin embargo, para la cuarta familia, sorprendentemente, las variantes obtenidas de la biblioteca de “ADN” sugerían un grado de igual a mayor de maduración *in vivo* en comparación con los Nanobodies identificados a partir de las bibliotecas de “PB” (tabla 2.2). El clon que se origina de “ADN” de esta familia muestra 15 mutaciones de AA (o 21 nt) en comparación con la línea germinal V y el valor promedio correspondiente para los Nanobodies que se originan de “PB” es de 14,6 (AA) o 21,7 (nt). Esto también se refleja en las potencias promedio en el ensayo de FACS de los Nanobodies de “ADN” y “PB”, que son 755 y 671, respectivamente. Para la quinta familia, se puntuó la maduración de las bibliotecas de “ADN” y “PB” como altamente similar ya que no se detecta clasificación sistemática entre los Nanobodies que se originan de “ADN” y “PB” tras los 4 métodos de análisis (mutaciones de AA o nt, FACS y ELISA).

Aunque no hay diferencia estadísticamente significativa entre potencias de unión promedio de los tres repertorios diferentes, la potencia promedio del repertorio de “PB” es similar a la obtenida de las bibliotecas de “célula”, que son mayores que las del repertorio de “ADN”. Sin embargo en el nivel monoclonal, se han identificado Nanobodies con potencias de unión similares después de inmunización genética sólo en comparación con los identificados después de refuerzo celular o una inmunización celular.

Ejemplo 3. Identificación de Nanobodies contra un canal iónico operado por ligando.

Como segundo ejemplo para demostrar la viabilidad de la inmunización genética para dianas unidas a membrana que portan dominios transmembrana múltiples, se eligió el purinoceptor de ratón P2X7.

P2X7 es un canal iónico dependiente de ligando, que se activa mediante altas concentraciones de ATP exógeno o mediante ribosilación de ADP dependiente de NAD. El canal funcional se forma mediante tres subunidades de proteína P2X7, consistiendo cada una en dos regiones que atraviesan la membrana y un bucle extracelular único de 285 residuos de AA. La activación del purinoceptor induce un cambio conformacional, llevando a la formación de un gran poro no selectivo, provocando finalmente formación de ampolla de membrana y apoptosis.

Se ha demostrado previamente que la inmunización genética con P2X7 eleva satisfactoriamente anticuerpos anti-P2X7 policlonales y monoclonales en conejos y ratas (Adriouch *et al.* 2005, Cell Immun 236, 72-77). En este caso se demuestra la identificación de Nanobodies específicos de P2X7 que modulan la activación de P2X7 inducida por

ligando tras inmunización genética.

Ejemplo 3.1. Inducción de una respuesta humoral en llama a mP2X7 mediante inmunización genética usando un método balístico.

La inmunización con pistola génica ha mostrado ser un método eficiente de liberación de ADN intradérmica para la inducción de una respuesta humoral en una gama diversa de animales, que incluye ratón, bovinos y llama (Koch-Nolte 2007, Faseb.J.21, 3490-3499). Este método de administración balístico libera micropartículas de oro recubiertas con ADN al tejido cutáneo altamente inmunocompetente a alta presión, inmediatamente seleccionando como diana y transfectando células efectoras inmunitarias presentes en la dermis tales como las células de Langerhans presentadoras de antígeno. Esto da como resultado eficiencia de transfección *in vivo* aumentada y en consecuencia una presentación de antígeno sostenida se consideró que estimulaban la inducción de respuestas inmunitarias humores.

Se inmunizaron tres llamas (407, 414 y 417) con ADN que codifica para P2X7 de ratón (mP2X7). El dispositivo usado para la liberación de ADN fue la pistola génica Helios (Biorad). Se recubrió plásmido de expresión de mP2X7 libre de endotoxinas pCDNA6.1-mP2X7 (Adriouch *et al.* 2005, Cell Immun 236, 72-77) sobre partículas de oro de 1 µm (Biorad, n.º de cat 1652263) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó la piel de la llama en la región del cuello como en el ejemplo 1.2. Cada llama recibió cuatro dosis de antígeno con intervalos de administración de dos semanas. Cada dosis consistió en 12 inyecciones de partículas de oro conjugadas con plásmido (1 µg de ADN conjugado sobre 0,5 mg de partículas de oro por inyección) aplicadas con una configuración de presión a 600 psi en la piel. Tres semanas después de la inmunización genética final, todas las llamas recibieron un refuerzo individual con 2×10^7 células Hek293 transfectadas con mP2X7. A intervalos regulares, se recogieron muestras de sangre para monitorizar la inducción de la respuesta inmunitaria humoral a lo largo del tiempo. Para el aislamiento de tejidos de células B, se recogió sangre de estos animales 3 y 9 días después de la cuarta inmunización con ADN (PBL1 y PBL2), y 4 y 8 días después del refuerzo celular (PBL3 y PBL4). Se tomó una biopsia del ganglio linfático (LN) palpable en la zona del arco 4 días después del refuerzo celular.

Se inmunizaron otras tres llamas (413, 415 y 416) por vía subcutánea en la zona del arco con 2×10^7 células Hek293 transfectadas de manera estable con mP2X7 (Adriouch *et al.* 2005, Cell Immun 236, 72-77) cuatro veces con intervalos de dos semanas. Se recogió sangre de estos animales 4 días y 8 días después de la cuarta inmunización y se tomó una biopsia de LN 4 días después de la cuarta inmunización.

Se monitorizó la respuesta sérica para reactividad de mP2X7 mediante citometría de flujo usando células CHO no transfectadas y transfectadas con mP2X7 de manera similar tal como se describe en el ejemplo 2.4. Para las llamas inmunizadas con ADN, se comparó la conversión sérica de mP2X7 entre la muestra sérica preinmunitaria (día 0), una muestra sérica recogida después de la inmunización final con ADN (día 51, PBL2) y una después del refuerzo celular (día 71, PBL4). Para las llamas inmunizadas mediante cuatro inyecciones celulares, se compararon los títulos específicos de mP2X7 entre una muestra inmunitaria recogida el día 52 y la preinmunitaria. La figura 3.1 muestra la respuesta inmunitaria total de IgG (anticuerpo convencional y de cadena pesada) de las seis llamas inmunizadas con mP2X7. Excepto para la llama 407, se observó un claro aumento en la fluorescencia celular media (MCF) de células CHO transfectadas con mP2X7 con la muestra sérica inmunitaria del día 71 recogida después del refuerzo celular, en comparación con el nivel preinmunitario (para como mínimo tres diluciones sometidas a prueba). Los valores de MCF frente a células CHO no transfectadas permanecen bajos. Tras el procedimiento de inmunización genética (sensibilización de ADN seguido por refuerzo celular individual), dos de tres llamas mostraron una respuesta humoral específica frente a la conformación de diana nativa. Los tres animales que han recibido inyecciones celulares múltiples muestran títulos séricos específicos de mP2X7 detectables (día 52). La respuesta de fondo frente a antígenos de superficie de células CHO irrelevantes es mayor en estos animales que en los inmunizados mediante inmunización genética (ADN+refuerzo celular).

Ejemplo 3.2: Inmunización con cóctel genético de P2X7humano y de ratón usando pistola génica.

Un beneficio de la inmunización genética es la versatilidad para generar una respuesta inmunitaria frente a múltiples dianas simplemente administrando diferentes genes que codifican para diana al mismo animal. También pueden usarse inmunizaciones con cóctel para sesgar la respuesta inmunitaria a una conformación específica. Como ejemplo de inmunizaciones con cóctel, se eligió ortólogos humanos (h) y de mP2X7, que comparten el 80,5% de identidad de secuencia global tal como se ilustra en la figura 3.2, para la inmunización con ADN con pistola génica de llamas. Además, para permitir la inducción de una respuesta inmunitaria al canal de P2X7 en su conformación abierta, se realizaron dos modificaciones con respecto a la estrategia de inmunización descrita en el ejemplo 3.1. En primer lugar, se aplicó una inmunización con cóctel con una mezcla de plásmidos que codificaban para mP2X7 y mART2.2, que es un activador conocido de P2X7 mediante la ribosilación de ADP. En segundo lugar, antes del refuerzo celular se trataron las células Hek293 transfectadas con P2X7 con ATP para activar el canal, después de lo cual se fijaron células usando paraformaldehído para conservar la conformación abierta.

Se inmunizaron dos llamas (405 y 418) simultáneamente con tanto h como mP2X7 usando inmunización genética con la pistola génica. Se conjugó una mezcla de pCDNA6.1-mP2X7 y pCDNA6.1-mART2.2 libre de endotoxinas

(razón 1:10) con partículas de oro de 1 μm . De manera similar, se conjugó el plásmido pCDNA6.1-hP2X7 que codifica para hP2X7 con partículas de oro de 1 μm . Se realizó la inmunización genética tal como se describe en el ejemplo 3.1 (1 μg /0,5 mg/inyección). Se usó el lado izquierdo del cuello para la inmunización con conjugados de mP2X7/mART2.2, mientras que se usó el lado derecho para la inmunización con conjugados de hP2X7. Tres semanas después de la cuarta inmunización con ADN, se reforzaron ambas llamas simultáneamente con 2×10^7 células Hek293 tratadas con ATP, fijadas con mP2X7 (lado izquierdo) y células hP2X7-Hek293 (lado derecho). Se proporcionó un segundo refuerzo en el lado izquierdo después de 3 días con 2×10^7 células Hek293 tratadas con ATP, fijadas con mP2X7. Para el aislamiento de tejidos de células B, se recogió sangre de estos animales 3 y 9 días después de la cuarta inmunización con ADN (PBL1 y PBL2), y 4 y 8 días después del primer refuerzo celular (PBL3 y PBL4). Se tomó una biopsia de LN de la zona del arco en el lado izquierdo 3 días después del primer refuerzo celular.

Se monitorizó la respuesta de título sérico de IgG total con respecto a mP2X7 de ambas llamas en citometría de flujo usando células no transfectadas y transfectadas con mP2X7, tal como se describe en el ejemplo 3.1. Con este fin se comparó la muestra sérica preinmunitaria (día 0) con muestras tomadas después de la inmunización con ADN (día 51, PBL2) y el refuerzo celular respectivo (día 71, PBL4). La llama 418 muestra una respuesta inmunitaria de IgG total clara a mP2X7 después de la inmunización con ADN, que se potencia adicionalmente después del refuerzo celular, mientras que la llama 405 sólo muestra reactividad a mP2X7 después del refuerzo celular (figura 3.3). Para ambas llamas, los valores de MCF en células CHO no transfectadas permanecen bajos. La reactividad sérica a P2X7 humana no se determinó. En conclusión, después de la inmunización genética y posterior refuerzo celular, 4 de 5 llamas muestran claras respuestas séricas a mP2X7.

Ejemplo 3.3: Inducción de una respuesta de anticuerpo de cadena pesada después de la inmunización genética.

Además, se monitorizó la inducción de una respuesta específica de mP2X7 mediada por anticuerpo de cadena pesada (HcAb) mediante FACS usando anticuerpos monoclonales específicos de isotipo de IgG de llama sobre transfectantes de Hek293-mP2X7 estables. Para someter a prueba este sistema, se adsorbieron previamente diluciones de sueros de llama (1/200 para llamas inmunizadas con ADN y 1/1000 para llamas inmunizadas con células) sobre 1×10^7 células Hek293 de WT a temperatura ambiente durante 1 hora para mermar los anticuerpos de fondo celulares. A continuación, se incubaron 5×10^5 células Hek293-mP2X7 o Hek293 no transfectadas con 0,1 ml de los sueros adsorbidos previamente durante 0,5 horas a 4°C (para evitar internalización), después de lo que se detectaron HcAb unidos mediante una mezcla de anticuerpos de ratón Anti-IgG2 e IgG3 de llama (Daley *et al.* 2005. Clin Diagn Lab Immunol 12:380-386) seguido por tinción con anti-IgG-PE de ratón (Jackson ImmunoResearch). La unión de anticuerpos de llama convencionales se detectó usando Anti-IgG1 de llama. Como control para la tinción de mP2X7, se incluyó el mAb Hano43 de rata (Adriouch *et al.* 2005, Cell Immun 236, 72-77). No pudieron determinarse títulos séricos de IgG específica de mP2X7 de llamas inmunizadas con Hek293-mP2X7 debido a altos niveles de unión de fondo de células Hek293, mientras que no se observaron tales fondos para la llama 407 inmunizada con ADN. La figura 3.4 muestra la respuesta sérica de anticuerpo convencional (panel A) y mediada por HcAb (panel B) después de la inmunización genética con mP2X7 (llama 414 y 417) o el cóctel de m y hP2X7 (llama 405 y 418). Después de la vacunación con ADN sólo, los sueros de las llamas 414 y 418 mostraron un claro desplazamiento de MCF en células Hek293 transfectadas con mP2X7 frente a células Hek293 de WT no transfectadas para la respuesta mediada por Ab convencional, confirmando las conversiones séricas detectadas mediante IgG total (en el ejemplo 3.1 y 3.2). El refuerzo celular indujo un desplazamiento de MCF mediado por Ab convencional de moderado (llama 417) a claro (llamas 405, 414 y 418) en células Hek293 transfectadas con mP2X7 frente a células Hek293 de WT no transfectadas. Se detectó una respuesta de HcAb moderada para las llamas 414 y 418 antes del refuerzo celular, que se potenció para la llama 414 mediante el refuerzo celular (compárense los sueros del día 71 y día 67). En cambio, sólo fue pequeña si se pudo detectar cualquier respuesta sérica de cadena pesada para las llamas 405 y 417 (figura 3.4-B). En conclusión, en dos de cinco llamas, la inmunización genética dio como resultado una respuesta de HcAb detectable a mP2X7 después del refuerzo celular.

Ejemplo 3.4. Construcción de bibliotecas.

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica a partir de muestras de sangre usando Ficoll-Hypaque según las instrucciones del fabricante (Amersham Bioscience). A continuación, se extrajo el ARN total de estas células así como de la biopsia de LN y se usó como material de partida para RT-PCR para amplificar fragmentos génicos que codifican para Nanobody (ejemplo 1.4). Para las cinco llamas inmunizadas con ADN 405, 407, 414, 417 y 418, se usó ADNc obtenido a partir de PBL1 y PBL2 después de inmunizaciones con ADN sólo para generar bibliotecas de "ADN", mientras que se usó el ADNc a partir de PBL3, PBL4 y LN para construir bibliotecas de refuerzo posterior (PB). Para las llamas inmunizadas con células Hek293-mP2X7, se usó ADNc obtenido a partir de PBL1, PBL2 y LN para la generación de bibliotecas. Se clonaron fragmentos correspondientes al dominio variable del repertorio de HcAb en vector de fagémido derivado de pUC119 que contiene el promotor LacZ, una secuencia que codifica para proteína pIII de fago de *E. coli*, un gen de resistencia frente a ampicilina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple y la secuencia líder de gen 3. Dentro del marco con la secuencia que codifica para Nanobody, el vector codifica para una etiqueta de c-myc de extremo C-terminal y una etiqueta de (His)₆. En total se generaron 13 bibliotecas de fago, denominadas 405-ADN, 405-PB, 407-ADN, 407-PB, 414-ADN, 414-PB, 417-ADN, 417-PB, 418-ADN 418-PB, 413-célula, 415-célula, y 416-célula. El tamaño de las bibliotecas de fago resultantes se estimó entre

0,12-2,5 x 10⁸ clones con porcentajes de inserto de entre el 83-100%. Se preparó el fago según métodos convencionales y se almacenó a 4°C para su uso adicional.

Ejemplo 3.5. Selección de Nanobody en células que expresan mP2X7 usando presentación de fago.

Para identificar Nanobodies que reconocen el purinoceptor de mP2X7 en su conformación nativa, se realizaron selecciones en células completas que expresan mP2X7 usando las 10 bibliotecas generadas a partir de animales después de vacunación con ADN y tres bibliotecas generadas a partir de llamas inmunizadas con células. Con el fin de comparar las características de los Nanobodies monoclonales identificados mediante diferentes métodos de inmunización, se realizaron selecciones en todas las bibliotecas en paralelo. En una primera ronda de selección, se bloquearon células CHO transfectadas con mP2X7 o células CHO no transfectadas (5 x 10⁶ por biblioteca) con tampón de bloqueo (suero bovino fetal (FBS) al 10% y Marvel al 2% en PBS) durante 30 minutos a 4°C. Como etapa de bloqueo previo, se incubaron todas las entradas de fago en tampón de bloqueo durante 30 minutos a 4°C. Se incubaron células con el fago bajo rotación lenta a 4°C, luego se centrifugaron y se lavaron tres veces con tampón de bloqueo y dos veces más usando PBS. Se eluyó fago unido a células usando tripsina, tal como en el ejemplo 1.4. Se infectaron todos los productos de fago en células TG1 de *E. coli* con crecimiento logarítmico y se sembraron en placas de agar (LB + Amp + glucosa al 2%) para análisis de clones de Nanobody individuales. Se calculó el enriquecimiento como la razón entre el número de fago eluido a partir de células mP2X7-CHO frente a las eluidas a partir de células CHO no transfectadas en selecciones paralelas. Sólo se pudieron observar enriquecimientos de primera ronda de selección mayores de 3 veces para las bibliotecas 413 y 414, mostrando incluso la biblioteca de PB de la última un enriquecimiento > 200 veces. Se rescataron los productos de fago seleccionados para mP2X7/CHO de ronda 1 y se usaron para una segunda ronda de selección en células Yac-1 de ratón, que expresan mP2X7 de manera endógena. El cambio en fondo celular se realizó para reducir la selección de fago unido a marcadores de fondo celular irrelevantes. Se siguió esencialmente el mismo procedimiento que para la ronda 1. Ya que no estuvieron disponibles células de control para esta segunda ronda, se calcularon los enriquecimientos relativos tomando la razón de las producciones de ronda 2 con respecto a ronda 1. De las bibliotecas de ADN, sólo se detectaron enriquecimientos para 407 y 417 (razón de 6 y 97, respectivamente). Para el repertorio de PB, 3 de 5 bibliotecas mostraron enriquecimientos por encima de 10, mientras que para 407 se observó un enriquecimiento moderado de 3 veces. No se observó enriquecimiento adicional para la biblioteca de PB 414, que puede ser debido al ya alto enriquecimiento de fago específico de antígeno durante la primera ronda de selección. De las bibliotecas inmunizadas con células, sólo 413 mostró un enriquecimiento moderado de 3 veces. Se hicieron crecer de cuarenta y cinco a 48 clones individuales de cada producto de selección (ronda 1 y ronda 2) en formatos de 96 pocillos y se preparó fago para examen posterior, tal como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3.6. Examen para Nanobodies específicos de mP2X7.

En primer lugar se determinó la especificidad de P2X7 mediante ELISA de fago en células CHO no transfectadas y transfectadas con mP2X7. Se sembraron células en placas de cultivo de 96 pocillo a una densidad de 4 x 10⁴ células por pocillo en 0,2 ml de medio de DMEM que contenía FBS al 10% complementado con penicilina y estreptomycin (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente) y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. Se lavaron las células subconfluentes con PBS y se fijaron usando paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos a TA. Las células fijadas se lavaron tres veces con PBS, y se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante 2 horas. Tras el bloqueo, se añadió fago que contenía sobrenadante de cultivo diluido 10 veces y se incubó durante 1 hora. Se detectó fago unido a célula conjugado anti-M13 de ratón -HRP (GE Healthcare, n.º de cat E2886). Se usó mAb Hano43 de rata como control positivo. 523 de 1506 clones individuales examinados derivados de todas las rondas de selección mostraron una señal de ELISA aumentada como mínimo 2 veces en células mP2X7-CHO en relación con células CHO de control. En la tabla 3.1 se muestran las tasas de acierto después del examen primario de bibliotecas de ADN, PB y célula.

Basándose en las tasas de acierto promedio en productos de selección de ronda 1 y 2 en repertorios generados después de las diferentes estrategias de inmunización (ADN, PB, célula), se calcularon eficiencias de descubrimiento como el 4, el 40 y el 11 (productos de ronda 1) o el 31, el 78, y el 60% (productos de ronda 2) para repertorios de "ADN", "PB" y "célula", respectivamente (figura 3.5). Esto indicó que la proporción de Nanobodies unidos a mP2X7 en los diferentes repertorios fue mayor para "PB" y "célula" que para "ADN". Para animales inmunizados con ADNc, se observó una buena correlación entre título sérico y tasa de acierto después de dos rondas de rondas de selección para bibliotecas de PB de las llamas 405, 418 y 414, con tasas de acierto que oscilan entre > 48% después de la ronda 1 y > 90% después de la ronda 2. En comparación, las tasas de acierto observadas con bibliotecas a partir de inmunización celular oscilaban entre el 40-73% después de dos rondas de selección. A pesar de la ausencia de un título sérico detectable en las llamas 407 y 417 después de inmunización con ADN (figura 3.1), la tasa de acierto de las bibliotecas de ADN correspondientes era del 25% y del 87%, respectivamente, después de 2 rondas de selección. Tal como se mostró previamente para CXCR4, esto indica que la vacunación con ADN es suficiente para identificar Nanobodies específicos de mP2X7 mediante la tecnología de presentación de fago, incluso en ausencia de una conversión sérica específica de diana detectable.

Ejemplo 3.7. Diversidad de secuencia de clones de unión a mP2X7.

Se analizaron las secuencias de todos los aglutinantes de mP2X7 en el examen. De 523 clones de Nanobody, se identificaron 84 clones únicos que pudieron categorizarse en 29 diferentes familias de secuencias (figura 3.13). El número de variantes de secuencia de aminoácidos de Nanobody que pertenecen a la misma familia se resume en la figura 3.6. Se han identificado respectivamente 15 y 14 familias después de la vacunación con ADN (ADN+PB) y la inmunización celular, dando como resultado una diversidad promedio de 3 familias después del método de inmunización con ADN+refuerzo celular y de 4,7 después de la estrategia de inmunización celular. Se identificaron cuatro familias de mP2X7 que comprendían variantes de familia de bibliotecas tanto de ADN como de PB, es decir familias 2, 15, 25 y 5 (figura 3.5). Dos de estos clones, 16D9 (familia 15, llama 414) y 6A11 (familia 5, llama 418), se identificaron a partir del repertorio tanto de ADN como de PB. Sin embargo, tal como se mostró antes para CXCR4, la mayoría de familias se identificaron exclusivamente en las bibliotecas de “ADN” (4 de 15 familias) o de “PB” (7 de 15 familias). Esto indica que el refuerzo celular tras las inmunizaciones genéticas produjo maduración *in vivo* de un repertorio de Nanobody no identificado fácilmente en una biblioteca generada después de sólo inmunizaciones genéticas (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Tasas de acierto de examen después de inmunización genética de mP2X7 y celular.

ID de llama	Estrategia de inmunización	Biblioteca	Título sérico FACS (IgG total)	Tasa de acierto de examen primario (%)		Familias NB identificadas
				R1	R2	
407	ADN (4x)	ADN	-	0,0	11,1	25
	mP2X7/HEK (1x)	PB	-	2,2	39,1	6, 25, 28
414	ADN (4x)	ADN	+/-	6,7	11,1	15, 26, 27, 29
	mP2X7/HEK (1x)	PB	++	73,9	93,5	1, 4, 15
417	ADN (4x)	ADN	-	11,1	86,7	2
	mP2X7/HEK (1x)	PB	+/-	2,2	60,9	2, 24
405	ADN de cóctel (4x)	ADN	-	0,0	0,0	-
	m+hP2X7/HEK (1x)	PB	+	47,9	97,9	7, 16
418	ADN de cóctel (4x)	ADN	+	2,1	50,0	5, 17
	m+hP2X7/HEK (1x)	PB	++	70,8	100,0	5
413	mP2X7/HEK (4x)	Célula	+	27,1	72,9	3
415	mP2X7/HEK (4x)	Célula	+	2,1	68,8	8, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 21
416	mP2X7/HEK (4x)	Célula	+	4,2	39,6	9, 13, 22, 23

Ejemplo 3.8. Confirmación de especificidad y clasificación de clones de unión a mP2X7 para la selección de clones representativos para cada familia.

Se volvieron a alinear todos los clones específicos de mP2X7 no redundantes en placas de 96 pocillos para la producción de PE en placas de 96 pocillos profundos de 1 ml, tal como se describe en el ejemplo 1. Para confirmar que los Nanobodies específicos de mP2X7 identificados después del examen para la unión a células fijadas también pueden unirse a mP2X7 nativo, se analizaron PE de todos los clones no redundantes para determinar la unión directa a células mP2X7-Hek293 en FACS usando la etiqueta de myc para la detección. Se incubó previamente PE diluido diez veces con 0,5 µg de anticuerpos anti-myc conjugados con FITC (AbD Serotec, n.º de cat. MCA2200F) (creando pseudo-Nanobodies bivalentes con el fin de aumentar la fuerza de unión) en 0,1 ml de PBS/FCS al 10% durante 45 minutos a 4°C. Se incubaron diluciones de PE con una mezcla de células Hek293-mP2X7 y no transfectadas (5×10^5 de cada una) durante 0,5 horas a 4°C, después de lo cual se aclararon las células y se detectó la fluorescencia unida a células mediante citometría de flujo. Alternativamente, se realizó tinción secuencial de PE diluido 10 veces con anticuerpos anti-myc conjugados con FITC después de la incubación con las células. Para los miembros de la familia de Nanobody 1, 2, 4, 5, 25 (de bibliotecas de ADN/PB) y 10 y 11 (de bibliotecas de inmunización celular), se observó un claro beneficio de avidéz, indicando que los epítotos de estos Nanobodies todavía son accesibles fácilmente para Nanobodies pseudo-dimerizados. El efecto de incubación previa para los Nanobodies 2C4 (familia 1) y 5A1 (familia 3) se ilustra en la figura 3.7. De cada familia, se seleccionó el mejor aglutinante para caracterización adicional. Las familias 6, 26-29 sólo mostraron baja unión a células que expresan mP2X7, incluso después de incubación previa con anticuerpos anti-Myc y, por tanto, se excluyeron de caracterización adicional. De las familias con clones únicos derivados de bibliotecas de tanto ADN como PB (familias 2, 5, 15 y 25), se seleccionaron al menos dos representativas para permitir la comparación de clones derivados de ADN y PB. A su vez, esto permitiría determinar la posible contribución del refuerzo celular sobre las potencias y afinidades de los Nanobodies respectivos. El panel de Nanobodies seleccionados para caracterización adicional se representa en la figura 3.8 y la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Caracterización de Nanobodies específicos de mP2X7.

Clon	Familia	Llama	Biblioteca	Función de P2X7	Veces de Cho-P2X7/wt (ELISA de fago)	Valoración de NB		Valoración de ligando	
						Cl ₅₀ (nM) frente a ATP 100 mM n=2	Cl ₅₀ (nM) frente a NAD 20 mM n=2	Cl ₅₀ (mM) de ATP por NB 2 mM n=1	Cl ₅₀ (mM) de NAD por NB 2 mM n=1
2C4	1	414	PB		4				
2A6	1	414	PB		8				
1A8	2	417	ADN		20				
20C9	2	417	PB		11				
7E2	3	413	Célula		25				
4B4	4	414	PB	potenciador	19			47	5
8G11	5	418	PB	bloquear	26	37	68	389	>540
8F5	5	418	ADN	bloquear	16	350	579	171	parcial
8G12	5	418	PB	bloquear	36	55	82	290	> 540
8C7	7	405	PB	bloquear parte	21	386*	4000*		
8E7	7	405	PB	bloquear parte	16	576*	4000*		
7D6	8	415	Célula	potenciador	18			47	4
7A4	9	415	Célula		32				
7B4	10	415	Célula		23				
7H6	11	415	Célula	bloquear	23	122,6	208,3	494	> 540
7G5	12	415	Célula	potenciador	30				
13B8	13	416	Célula		24				
7D5	14	415	Célula		14				
1G6	15	414	ADN		12				
16D9	15	414	ADN, PB		7				
6B7	16	405	PB	bloquear parte	24				
14D5	17	418	ADN	potenciador	8			16	2
13G5	18	415	Célula		35				
13B5	19	415	Célula	bloquear parte	28	436	3653	200	parcial
13F6	20	415	Célula		20				
13G4	21	415	Célula		56				
13A7	22	416	Célula	bloquear	25	6	11	565	> 540
13G9	23	416	Célula	bloquear	17	35	136	469	> 540
20A11	24	417	PB		11				
18C1	25	407	ADN		18				
18A7	25	407	PB		14				

5 * Los Nanobodies se sometieron a prueba n=1

Ejemplo 3.9. Producción y purificación de Nanobodies específicos de mP2X7.

- 10 Se volvieron a clonar las secuencias codificantes de los Nanobodies seleccionados en un vector de expresión derivado de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia frente a kanamicina, un sitio de clonación múltiple y la secuencia peptídica de señal de OmpA (tal como se describe en el ejemplo 2.8). Dentro del marco con la secuencia que codifica para Nanobody, el vector codificó para una etiqueta de c-myc de extremo C-terminal y una etiqueta de (His)₆. Se produjo expresión en células TG-1 de *E. coli* como proteínas etiquetadas con c-myc, His₆ en un volumen de cultivo de 250 ml. Se indujo expresión mediante la adición de IPTG 1 mM y se permitió continuar
- 15 durante 3 horas a 37°C. Después de centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplásmicos mediante congelación-descongelación de los sedimentos y resuspensión en dPBS. Estos extractos se usaron como material de partida para cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) usando columnas en bruto Histrap FF (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se eluyeron los Nanobodies® de la columna con imidazol 250 mM y posteriormente se desalaron hacia dPBS. Se verificó la pureza e integridad de todos los Nanobodies mediante
- 20 electroforesis en gel de poliácridamida (SDS-PAGE), mientras que se verificó la presencia de etiquetas mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos anti-His para la detección.

Ejemplo 3.10. Ninguno de los Nanobodies de P2X7 de ratón es reactivo de manera cruzada a P2X7 humano o a

P2X4.

Se analizó la unión de mP2X7 dependiente de la concentración de Nanobodies purificados usando células CHO que expresan mP2X7 estables en FACS. Se prepararon diluciones en serie de Nanobodies que oscilaban entre 1,2 μ M y 6,7 pM y se incubaron con 2×10^5 células en 0,1 ml de dPBS complementado con FBS al 10% (tampón de FACS) durante 0,5 horas a 4°C. A continuación, se lavaron las células tres veces, y se detectó Nanobody unido usando anti-Myc de ratón (Serotec MCA2200) y posterior tinción con anti-IgG-PE de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories 115-116-164). Como control positivo, se usó sobrenadante de hibridoma del anticuerpo Hano43 de rata, que se visualizó mediante IgG-PE anti-rata (Jackson ImmunoResearch Laboratories 112-116-143). Los resultados se representan en la figura 3.8. El máximo valor de MCF obtenido con un Nanobody de control irrelevante osciló entre 314 y 355 (concentraciones entre 1,2 μ M y 6,7 pM). Para los Nanobodies 7D5 (familia 14), 13A7 (familia 22) y 7E2 (familia 3), los valores de CE_{50} son 3, 3,4 y 4,3 nM, respectivamente. Para el resto de Nanobodies sometidos a prueba, no se obtuvo curva sigmoidea y en consecuencia no se pudieron determinar valores de CE_{50} (figura 3.8). Es de destacar, que los Nanobodies de unión más fuerte derivaban todos de las tres llamas inmunizadas con células Hek293-P2X7. Se confirmó unión específica para todos los Nanobodies, excepto para 2C4, 20A11 y 13F6 para los que no se detectó valor de MCF por encima de 600.

En segundo lugar, se determinó la especificidad de Nanobodies de las 24 familias mediante análisis de unión reactiva de manera cruzada a células Hek293 que expresan el ortólogo humano de P2X7, y células CHO que expresan hP2X4, otro miembro de la familia de purinoceptor P2X (Möller *et al.* Purinergic Signal 3:359-366, 2007). De cada Nanobody se incubaron previamente 250 ng (concentración final de 147 nM) con anticuerpos anti-Myc conjugados con FITC, siguiendo el mismo procedimiento tal como se describe en el ejemplo 3.7 excepto que no se incluyeron células Hek no transfectadas. Como controles positivos, se usaron anticuerpos L4 (específicos para hP2X7, Buell *et al.* Blood 15: 3521-3528) y CR29 (específicos para hP2X4, Möller *et al.* Purinergic Signal 3:359-366, 2007), mientras que se incluyó un Nanobody irrelevante como control negativo. No se encontró que ninguno de los Nanobodies se uniera a células CHO que expresan hP2X4 o hP2X7-Hek293. A pesar del hecho de que se aislaron algunos Nanobodies de llamas inmunizadas con tanto h como mP2X7 (familias 5, 7, 16, y 17), ninguno de estos era reactivo de manera cruzada a hP2X7.

Ejemplo 3.11. Identificación de Nanobodies que potencian o bloquean la función de receptor de mP2X7.

Se analizaron todos los Nanobodies purificados de 24 familias diferentes por su capacidad para modular la actividad funcional del purinoceptor de mP2X7. La activación de P2X7 se produce mediante ATP extracelular (activación directa) o ribosilación de ADP dependiente de NAD (activación indirecta) y da como resultado liberación de calcio, exposición de fosfatidilserina y liberación de CD62L, llevando finalmente a apoptosis (Scheuplein *et al.* 2009, J. Immun. 182(5):2898-908). Se usó la liberación de CD62L inducida por ligando para determinar si los Nanobodies podrían interferir con la función de mP2X7.

En un primer enfoque, se incubaron 5×10^5 células Yac-1 (que expresan de manera endógena mP2X7) con una sola concentración de Nanobodies (5 μ g, concentración final de 2 μ M), en RPMI complementado con FBS al 10% durante 15 minutos a TA. Posteriormente, se activó el canal iónico de P2X7 mediante adición de ATP hasta una concentración final de 100 μ M, o NAD hasta una concentración final de 20 μ M, seguido por incubación adicional de la suspensión celular durante 20 minutos a 37°C. Experimentos de valoración previos indicaron que estas concentraciones de ligando indujeron escisión de ectodominio de CD62L máxima. Se lavaron las células y se detectó la presencia de CD62L de superficie celular en FACS usando anticuerpos anti-CD62L conjugados con PE (BD Pharmingen, n.º de cat 553151). El porcentaje de células teñidas positivamente para CD62L se tomó como medida para la modulación de función P2X7. Como controles, no se incluyeron Nanobody o Nanobody de control irrelevante, lo que dio como resultado liberación de CD62L por el 80-98% de las células, es decir el 2-20% de las células que permanecieron positivas para CD62L, dependiendo del ligando y experimento individual. Se consideró un Nanobody como un bloqueador de mP2X7 cuando el porcentaje de células que permanecieron positivas para CD62L era más de 3 veces el valor obtenido con el Nanobody irrelevante. Diez Nanobodies, que representan siete familias (familias 5, 7, 11, 16, 19, 22, y 23), bloquearon la liberación de CD62L inducida tanto por ATP como por NAD, estando los dos Nanobodies de la familia 7 justo por encima del umbral. Además, dos Nanobodies que pertenecen a las familias 16 y 19 parecieron bloquear la respuesta inducida por NAD pero no la inducida por ATP, sugiriendo que estos pueden seleccionar como diana selectivamente el sitio de ribosilación de ADP dependiente de NAD en mP2X7 (Adriouch *et al.* FASEB J 22:861-869, 2008). Con el fin de confirmar las capacidades inhibitoras, así como para clasificar las potencias de bloqueo de Nanobody en los ensayos de liberación de CD62L mediados por ATP y NAD, se sometieron a prueba 9 de estos 10 Nanobodies en diluciones en serie en dos experimentos en paralelo. Se muestra un ejemplo representativo en la figura 3.9. Puede confirmarse la inhibición de la función de P2X7 para todos los bloqueadores en ensayos mediados por ambos ligandos y se presentan valores de CI_{50} en la tabla 3.2. No se confirmó el NAD sugerido de manera selectiva para el Nanobody 13B5 de familia 19. Basándose en la potencia de bloqueo, los Nanobodies pueden clasificarse tal como sigue: 13A7 > 8G11, 13G9, 8G12 > 7H6 > 13B5, 8F5 > 8C7, 8E7.

Para verificar si los Nanobodies por sí mismos podrían activar el canal de mP2X7, también se incubaron células con Nanobodies 2 μ M sin posterior tratamiento con ligando.

Ninguno de los Nanobodies monovalentes sometidos a prueba pudo activar directamente mP2X7. Sin embargo, para determinados Nanobodies, se observó un aumento en la liberación de ectodominio de CD62L después del tratamiento con nucleótido, sugiriendo que estos clones pueden facilitar el control de mP2X7. Se verificó la potenciación de activación de P2X7 inducida por ATP y NAD usando concentraciones de ligando por debajo de la óptima: por debajo de 100 μ M para ATP y por debajo de 20 μ M para NAD. Se trataron células Yac-1 con una concentración fija de Nanobody (2 μ M) y a continuación se estimularon con concentraciones crecientes de ATP (1-2700 μ M) o NAD (1-540 μ M). En el caso de ATP, se encontró que tres Nanobodies potenciaban claramente la liberación de CD62L en el siguiente orden de eficacia: 14D5 > 4B4 = 7D6 (figura 3.10). Para NAD la potenciación fue menos evidente.

También se sometieron a prueba Nanobodies de bloqueo en los mismos ensayos (a una concentración fija de Nanobody frente a concentraciones crecientes de ligando). A la concentración más alta de NAD sometido a prueba (540 μ M), la mayoría de bloqueadores todavía inhibían la escisión al máximo, con la excepción de 13B5 y 8F5 que alcanzaron una meseta alrededor del 60% de inhibición (figura 3.10). Basándose en la curva de valoración obtenida con ATP pudieron realizarse las siguientes clasificaciones en bloqueadores; 13A7, 13G9, 7H6 > 8G11, 8G12 > 8F5, 13B5 (tabla 3.2). Comparando los tres Nanobodies de familia 5, ambos clones derivados de las bibliotecas de PB (8G11 y 8G12) fueron bloqueadores con respecto al clon de la biblioteca de ADN (8F5).

Se identificaron Nanobodies que modulan el receptor (bloqueadores y potenciadores) a partir de los tres repertorios "ADN", "PB" o "célula" con el bloqueador más potente, 13A7, (CI_{50} de 6 nM y 11 nM en ensayo de ATP y NAD, respectivamente) identificados a partir de una biblioteca de "célula". En cambio, el potenciador más potente, 14D5, se identificó a partir de una biblioteca de "ADN".

Ejemplo 3.12. Nanobodies multivalentes con potencias de modulación de receptor mejoradas.

Se generaron constructos de Nanobody bivalentes, que consistían en una fusión genética de cabeza a cola de dos secuencias de Nanobody idénticas conectadas por un ligador GlySer de 35 aminoácidos a partir de los Nanobodies de bloqueo funcional, 13A7 (familia 22, célula) y 8G11 (familia 5, PB), así como a partir de agonista parcial 14D5 (familia 17, ADN). Se constituyeron los constructos mediante reacciones de PCR independientes (una para la subunidad de Nanobody de extremo N-terminal, y una para la de extremo C-terminal) usando diferentes conjuntos de cebadores que abarcan sitios de restricción específicos. Se usó un vector de expresión derivado de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia frente a kanamicina y la secuencia peptídica de señal OmpA. En el sentido de 3' de manera directa del péptido de señal estaba presente un sitio de clonación múltiple para inserción de Nanobody, seguido por un ligador 35Gly-Ser que codifica la secuencia de ADN y un segundo sitio de clonación múltiple para la clonación de una segunda secuencia de Nanobody. Dentro del marco con la secuencia de codificación Nanobody-35Gly-Ser-Nanobody resultante, el vector codificó para una etiqueta de c-myc de extremo C-terminal y una etiqueta de (His)₆. Después de la verificación de las secuencias de nucleótidos, los tres constructos de Nanobody de mP2X7 bivalentes se expresaron y purificaron. Se realizó la producción en células TG1 de *E. coli*, seguido por purificación de la fracción periplásmica mediante la etiqueta de His mediante IMAC y desalado, esencialmente tal como se describe en el ejemplo 3.9.

Se compararon las potencias de 14D5 monovalente y bivalente en la potenciación de la actividad de mP2X7 midiendo la potenciación de liberación de ectodominio de CD62L a concentraciones de nucleótido por debajo de la óptima (ATP 33 μ M, NAD 1,5 μ M), en la que no se produce liberación de ectodominio en células Yac-1 (tal como se describe en el ejemplo 3.11). El aumento en potencia de 14D5 bivalente frente a 14D5 monovalente era de aproximadamente 220 veces para la liberación inducida por ATP (CE_{50} de 0,1 frente a 22,6 nM) y 40 veces para NAD (CE_{50} 0,06 frente a 4,1 nM). En ausencia de ligando, ni 14D5 monovalente ni bivalente puede inducir control de P2X7.

Tal como se ilustra en la figura 3.11, las potencias de los dos Nanobodies de bloqueo 13A7 y 8G11 se determinaron a ATP 100 μ M y NAD 20 μ M, respectivamente. Los bivalentes de 13A7 y 8G11 tenían potencias en el intervalo por debajo de nanomolar tanto para ATP como NAD. El aumento de potencia de 13A7 bivalente frente a 13A7 monovalente fue sólo moderado, con un aumento de 23 veces en el caso de NAD y un aumento de 9 veces en el caso de liberación inducida por ATP (CI_{50} bivalente 0,1 nM para ATP, y 0,3 nM para NAD). Para 8G11 el aumento de potencia de mono a bivalente fue mucho más fuerte, con 146 veces (NAD) y 84 veces (ATP) (CI_{50} bivalente 0,2 nM para ATP, y 0,52 nM para NAD).

Ejemplo 3.13. Mapa de Nanobodies para diferentes epítomos en el trímero de mP2X7.

Recientemente, se publicó la estructura cristalina del purinoceptor P2X4 de pez cebra (Kawate *et al.* 2009. Nature 460:592-598). Basándose la estructura de P2X4 disponible (pdb3I5D y pdb3H9V con resoluciones a 3,5 y 3,1 Å, respectivamente), se construyó un modelo para mP2X7 usando software de modelado por homología (modelador construido en Discovery Studio, Accelrys). La identidad de secuencia entre mP2X7 y P2X4 de pez cebra comprende el 49% en la región extracelular. En primer lugar, la secuencia del P2X7 de ratón se alineó con la secuencia de la

estructura de P2X4 conocida. La alineación de secuencia se encarga de un posicionamiento adecuado de los huecos entre las 2 secuencias y de los enlaces disulfuro conservados. En segundo lugar, las coordenadas 3D de la estructura de P2X4 conocida se usan para predecir las del mP2X7 desconocido. Una función de densidad de probabilidad (pdf) describe las limitaciones en las características geométricas y se usa para evaluar el modelo 3D.

De un panel existente de mutantes de arginina de mP2X7 que muestran expresión de mP2X7 extracelular a un nivel similar que mP2X7 de WT, se seleccionaron siete mutantes (Adriouch *et al.* 2008, FASEB J 22:861-869, Schwarz *et al.* Purinergic Signal 5:151-161, 2009). Según el modelo generado, estos siete mutantes representan seis regiones dispersadas estructuralmente en la molécula de mP2X7; R125A mutante (sitio I; residuo R125 crítico para ribosilación mediada por NAD), R294A (sitio I; residuo ubicado hendido crítico para unión de ATP), R206A (sitio II; mutante de ganancia funcional ubicado cerca la superficie de contacto de dos monómeros que interactúan con mP2X7); R151A (sitio III; residuo crítico para unir mAb Hano44 anti-mP2X7; Adriouch *et al.* 2008, FASEB J 22:861-869); R178A (sitio IV); R230A (sitio V); R53K (sitio VI; residuo ubicado cerca del dominio transmembrana en la superficie de contacto de dos monómeros que interactúan con mP2X7). Con el fin de determinar si la unión de los Nanobodies a mP2X7 puede verse afectada por estas sustituciones, se evaluaron 24 Nanobodies purificados que representan diferentes familias para la unión a células Hek293 no transfectadas y células Hek293 transfectadas de manera transitoria con receptores de mP2X7 de WT o mutantes. Para ensayos de citometría de flujo, se realizó detección de Nanobodies mediante anti-Myc y posterior conjugado de cabra anti-PE de ratón, mientras que se obtuvo una estimación de densidades de expresión de P2X7 mediante tinción con Hano43 monoclonal de rata seguido por conjugado anti-PE de rata secundario. Después de la normalización de densidades de expresión a lo largo de los diferentes transfectantes transitorios (mP2X7 de WT y 7 mutantes) mediante resta de unión de fondo a células Hek293, se calculó la unión residual de los diferentes Nanobodies a 1 μ M.

Se detectó una reducción de la unión > 90% sólo para seis Nanobodies, todos para el mutante R151A: Nanobody 7H6 (célula, 415, fam 11), 7D5 (célula, 415, fam 14), 6B7 (PB, 405, fam 16), 7E2 (célula, 413, fam 3), 8G11 (PB, 418, fam 5), 8G12 (PB, 418, fam 5). Esto implica que los otros Nanobodies no son dependientes de manera crítica de Arg151 para la unión, o bien porque se unen a regiones independientes, o bien que estos Nanobodies no se unen al residuo dentro de su huella. Tal como se esperaba, el anticuerpo Hano44 de rata específico de mP2X7 no mostró ninguna unión a R151A mutante.

Ejemplo 3.14. La potencia promedio del repertorio de "ADN" es comparable a la de "PB" pero menor que la del repertorio de "célula".

Sólo se identificaron cuatro familias a partir de las bibliotecas tanto de "ADN" como de "PB". Se puntuó la maduración *in vivo* para cada variante dentro de la familia de Nanobody específica en relación con la secuencia de línea germinal V de llama relacionada más cercana (que comprende de FR1 a FR3) como en el ejemplo 2.10 y se compararon potencias de variante de Nanobody (tabla 3.3). Para la familia 2, 5, 15 y 25, los Nanobodies que se originan de "PB" mostraron como promedio 19,5, 16,5, 10 y 14 mutaciones de AA frente a la secuencia de línea germinal génica V parental, mientras que respectivamente 19,5, 17, 10,3 y 15 para los Nanobodies derivados de la biblioteca de "ADN", que disputa por la igual maduración de los Nanobodies que se originan de "ADN" y "PB". Cuando se comparan las secuencias de las regiones de CDR3 de miembros de familia derivados de ADN y PB, se observa un aumento en la diversidad en el PB en relación con las secuencias de ADN sólo para las familias 5 y 25.

Tabla 3.3. Distancia genética de Nanobodies madurados *in vivo* frente a secuencias de línea germinal V parentales.

Familia de Nanobody (llama)	Variante de Nanobody dentro de la familia	Línea germinal de llama	Biblioteca	Potencia de interacción con diana		Número de mutaciones de AA frente a línea germinal V parental ¹	Número de AA en CDR3 diferentes a clon de ADN
				MFI FACS (incubación de Myc previa)	(razón de absorción; ELISA)		
2 (417)	1C9	VHH1e	ADN	19	6	19	0
	1A8		ADN	18	21	20	0
	20C9		PB	97	11	20	0
	20B10		PB	85	8	19	0
5 (418)	14F6	VHH2a/b	ADN	nd	15	16	0
	8B4		ADN	71	13	17	0
	8H5		ADN	24	12	18	0
	6A11		ADN+PB	53	17	18	0
	8E6		ADN	69	12	19	0
	14G4		ADN	nd	34	19	0
	8F5		ADN	143	16	15	2
	8H6		ADN	43	17	15	2
	8H4		ADN	65	27	17	2
	14F10		PB	nd	19	17	1

	14G11		PB	nd	30	18	2
	8G11		PB	166	26	19	1
	8G12		PB	166	36	16	1
	8D10		PB	94	18	16	1
	8H10		PB	94	19	16	1
	8B12		PB	93	38	16	1
	8C12		PB	89	28	15	1
	6H10		PB	44	7	15	0
	8A11		PB	17	11	16	1
15 (414)	16D9	VHH-3	ADN+PB	53	7	10	0
	19C2		ADN	64	18	10	0
	19E3		ADN	55	8	10	0
	1G6		ADN	11	12	11	0
25 (407)	18C1	VHH-1e	ADN	63	18	15	0
	18A7		PB	69	14	14	2

¹ Se considera cualquier cambio, incluyendo una delección o una adición para calcular el número de mutaciones.

Las razones de adsorción promedio (ELISA) de 20, 37 y 29 variantes de Nanobody que se originan respectivamente a partir de los repertorios de “ADN”, “PB” y “célula”, son 13, 13 y 26, respectivamente (figura 3.12), indicando la superioridad de Nanobodies que se originan de “célula” para esta diana. Estas observaciones también se reflejan al nivel de Nanobody monoclonal, ya que se identificaron tanto los aglutinantes más potentes (13A7, 7D5 y 7E2, ejemplo 3.10) como el bloqueador más potente (13A7) a partir del repertorio de “célula”. Sin embargo, cuando se consideran familias individuales, se observa para la familia 5 (pero no las otras) un claro aumento en la potencia promedio del repertorio de PB frente al de ADN (23 frente a 18 razones de adsorción, y 95 frente a 66 de intensidad de fluorescencia media por FACS). Esto sugiere que se produjo maduración de afinidad como resultado del refuerzo celular en esta familia. En las otras tres familias, el refuerzo celular no mejoró la potencia. En la clasificación de las potencias de los Nanobodies funcionales, sin embargo, el potenciador más potente 14D5 se origina a partir del repertorio de ADN, mientras que el segundo mejor bloqueador deriva de la familia 5 del repertorio de PB. Se identificaron ambas familias a partir de la llama 418, que era la llama que mostraba la respuesta sérica mediada por HcAb más intensa después de inmunización con ADN (figura 3.4 B).

Ejemplo 3.15. Las inmunizaciones genéticas con un cóctel de dianas permiten la identificación de Nanobodies específicos para cada diana individual.

La inmunización de animales exógamos tales como llama dio como resultado magnitudes de respuesta humoral específica de diana altamente variables entre los animales individuales. Este efecto es incluso más pronunciado después de la inmunización genética con receptores de superficie celular de baja inmunogenicidad que contienen múltiples dominios transmembrana tales como GPCR y canales iónicos (ejemplos 2.4 y 3.1). Se espera que una respuesta específica de diana mediada por HcAb detectable aumente al menos la eficiencia del descubrimiento. En consecuencia, sería favorable la inmunización genética de animales exógamos con cócteles de diana de cualquier tipo (moléculas unidas a células y no unidas a células): un mayor número de animales aumenta las oportunidades de identificar más animales que respondan a diana (de alta magnitud) sin cargar la disponibilidad. Como ejemplo de vacunación con ADN de cóctel, se inmunizaron dos llamas (405 y 418) con dos canales iónicos de P2X7 de origen de ratón y humano tal como se describe en el ejemplo 3.2. Ya que la identidad de aminoácidos entre P2X7 de ratón y humano es lo suficientemente diferente (el 80,5% de identidad de secuencia) y todos los Nanobodies identificados de P2X7 de ratón carecen de reactividad cruzada con P2X7 humano (ejemplo 3.10), puede utilizarse P2X7 de ratón y humano como ejemplos de dianas relevantes para demostrar el enfoque de inmunización genética con cóctel.

Con el fin de identificar Nanobodies específicos de hP2X7, se realizaron selecciones basándose en células para enriquecer Nanobodies específicos de hP2X7 esencialmente tal como se describe en el ejemplo 3. Se realizaron selecciones en bibliotecas de “ADN” (PBL1+2) y “PB” (PBL2+PBL3+LN) agrupadas de cada llama 405 y 418 para mantener toda la diversidad, pero conservando las bibliotecas independientes por animal. Se usaron células YAC-1 transfectadas con hP2X7y células CHO transfectadas con hP2X7-ART2.2 estables para la primera y segunda rondas de selección, respectivamente. Después de la segunda ronda de selección, se calculó el enriquecimiento como la razón del número de fago eluido de células transfectadas con hP2X7 frente a células CHO no transfectadas. El enriquecimiento fue de 15 y 7 veces para las bibliotecas de llamas 405 y 418, respectivamente, indicando la presencia de Nanobodies de hP2X7 y sugiriendo identificación satisfactoria de Nanobodies frente a ambos canales iónicos.

Después de la infección de TG1 de *E. coli* con productos de fago después de la selección de hP2X7, se escogerán clones individuales y se prepararán extractos periplásmicos como en el ejemplo 1.4. Los extractos periplásmicos se usarán para determinar la especificidad para P2X7 humano mediante citometría de flujo, de manera similar a como se realizó para P2X7 de ratón (ejemplo 3.5). Los extractos periplásmicos que muestran clara tinción en una línea celular transfectada con hP2X7 (tal como CHO o HEK293), aunque no por encima del fondo en una línea celular

parental idéntica transfectada con P2X7 de ratón o la misma línea celular de WT no transfectada, se considerarán que son específicos para hP2X7. Se confirmará la especificidad de hP2X7 de manera dependiente de la dosis usando Nanobody purificado mediante el mismo método para determinar CE_{50} .

- 5 Ejemplo 4.1. Inducción de un título sérico humoral específico de CXCR7 tras la inmunización genética de llama usando la pistola génica Helios.

10 Como segundo ejemplo de GPCR para identificar Nanobodies específicos de diana después de la inmunización genética, se eligió el receptor de quimiocina CXCR7. Se clonó ADNc que codifica para CXCR7 humano en pVAX1 y se purificó ADN plasmídico tal como se describe en el ejemplo 2.1. Después de la transfección, el constructo pVAX1-CXCR7 mostró expresión de CXCR7 nativo en la superficie celular, confirmado por la tinción diferencial de células transfectadas con CXCR7 frente a de WT parentales siguiendo un método de detección similar al descrito en el ejemplo 2.2 (datos no mostrados).

15 Se inmunizaron cuatro llamas (391, 395, 396 y 397) mediante inyección de chorro intradérmica tal como se describe en el ejemplo 2.4. Se administró una inyección individual de 2×10^7 células CAKI/hCXCR7 de 42 a 56 días después de la cuarta inmunización de ADN. Se inmunizaron tres llamas (385, 387 y 404) con 4 inyecciones de 2×10^7 células CXCR7/HEK293 transfectadas de manera estable con intervalos de 14 días. Se determinó el título de IgG sérico específico de CXCR7 de manera similar que en el ejemplo 2.4 usando muestras séricas preinmunitarias e inmunitarias después de vacunación con ADN y después del refuerzo celular individual. Ninguna de las siete llamas mostró una respuesta humoral específica de CXCR7 tras los dos regímenes de inmunización.

25 En otro experimento de inmunización, se inmunizaron genéticamente cuatro llamas (434, 439, 441 y 444) usando una pistola génica Helios tal como se describe en el ejemplo 3. En resumen, se aplicaron 4 dosis de ADN (24 inyecciones por dosis) a intervalos de dos veces por semana seguido por un refuerzo celular individual de células CAKI transfectadas con CXCR7 (células 2E7). Se recogió de cada llama una muestra de sangre preinmunitaria, una 8 días después de la cuarta administración de ADN y una muestra de sangre final 8 días después del refuerzo celular individual y se determinó el título sérico específico de diana mediante FACS tal como se describe en el ejemplo 2.4. De cuatro llamas inmunizadas, sólo una única llama (444) mostró un MCF moderado aunque sistemáticamente aumentado con la muestra sérica de "ADN" y refuerzo celular posterior en células HEK293 transfectadas con CXCR7 en comparación con el nivel preinmunitario para todas las diluciones sometidas a prueba (figura 4.1). En paralelo, se inmunizaron cuatro llamas (435, 436, 437, 440) con células CAKI transfectadas con CXCR7 mediante cuatro inyecciones celulares (2×10^7 células por inyección) a intervalos de 2 semanas. Al contrario que la llama 444, ninguna de las últimas cuatro llamas mostró un título sérico de CXCR7 detectable.

35 Ejemplo 4.2. Identificación de Nanobodies específicos de diana en ausencia de una conversión sérica específica de CXCR7 detectable.

40 Se construyeron bibliotecas a partir de tejidos inmunitarios recogidos después de la inmunización genética y después del refuerzo celular (repertorio de ADN y PB, respectivamente) para cada una de las llamas 391, 395, 396 y 397. Se construyeron tres bibliotecas adicionales a partir de las llamas inmunizadas con células 385, 387 y 404. En la tabla 4.1 se resume una visión general de las bibliotecas. Se realizaron selecciones de presentación de fago con las 11 bibliotecas en 10 (ronda de selección 1 y ronda 2) y 1 (ronda de selección 2) unidades de vesículas de membrana de CXCR7 tal como se describió antes (ejemplo 2.6). Se examinaron 853 clones de todos los productos de selección de ronda 2 (entre 31 y 155 clones individuales por biblioteca); los resultados se resumen en la tabla 4.1. Se determinó la especificidad de CXCR7 mediante ELISA de fago en 2 unidades de vesículas de membrana de CXCR7 aplicando diluciones de 10 veces de sobrenadante de fago preparado a partir de un cultivo de 1 ml. Se consideró que 234 Nanobodies, que mostraban una señal de ELISA aumentada como mínimo 2 veces en vesículas de membrana de hCXCR7 sobre vesículas de membrana de control no transfectadas, eran específicos de CXCR7. En la tabla 4.1 se resumen las tasas de acierto de ronda 2 por animal y repertorio, que oscilan entre el 4 y el 61%. Basándose en las tasas de acierto promedio en productos de selección de ronda 2 siguiendo las diferentes estrategias de inmunización, se calcularon las eficiencias de descubrimiento como el 29, el 28 y el 26% para repertorios de "ADN", "PB" y "célula", respectivamente (figura 4.2). Incluso en ausencia de un título de HcAb detectable para CXCR7, se identificaron Nanobodies específicos de diana a partir de todas las estrategias de inmunización (ADN, PB, célula). Se secuenciaron los 234 Nanobodies específicos de CXCR7 y se retiraron los Nanobodies redundantes (secuencia de AA idéntica). Esto dio como resultado la identificación de 78 secuencias únicas, que pertenecen a 46 distintos linajes de células B de Nanobody (tabla 4.1). El número de variantes (como mínimo 1 residuo de AA de diferencia) identificadas dentro de una familia osciló entre 1 y 12. El número promedio de familias de Nanobody específicas de CXCR7 identificadas por llama es de 5,3 después de inmunizaciones celulares (385, 387, 404) y 7,5 mediante inmunización con ADN (ADN+refuerzo celular; 391, 395, 396, 397), respectivamente, mostrando que para esta diana, la inmunización genética (ADN+PB) dio como resultado una mayor diversidad de familia de Nanobody en comparación con la diversidad obtenida mediante inmunizaciones celulares.

65

Tabla 4.1. Visión general de descubrimiento de familias de Nanobody específicas de CXCR7.

ID de llama	Inmunógeno	Respuesta de CXCR7 (FACS)	Biblioteca	Tasa de acierto de examen de especificidad (ELISA)	Número de familias de Nanobody específicas de CXCR7 diferentes (algunas de las cuales se están desplazando)
391	ADN	-	ADN	26% (12/46)	4
	CXCR7/CAKI	-	PB	18% (8/44)	2
395	ADN	-	ADN	45% (62/138)	6
	CXCR7/CAKI	-	PB	29% (9/31)	4
396	ADN	-	ADN	17% (8/46)	3
	CXCR7/CAKI	-	PB	61% (22/36)	2
397	ADN	-	ADN	17% (24/138)	6
	CXCR7/CAKI	-	PB	10% (4/42)	3
385	CXCR7/Hek29 3	-	Células	46% (71/155)	7
387	CXCR7/Hek29 3	-	Células	4% (2/45)	2
404	CXCR7/Hek29 3	-	Células	9% (12/132)	7

Para identificar Nanobodies que modulan la función del receptor, se realizó un ensayo de desplazamiento de ligando SDF-1 usando extractos de membrana de CXCR7/HEK293 de manera similar tal como se describe para CXCR4 (ejemplo 2.7). Se consideró que los Nanobodies que mostraban una clara reducción en la unión de [¹²⁵I]-SDF-1 residual a extractos de membrana de CXCR7/HEK293 eran competidores de ligando. El número de familias de Nanobody puntuadas como desplazador de ligando se ilustra en la tabla 4.1, mostrando que se identificaron Nanobodies que compiten con ligando independientemente de la estrategia de inmunización (representada por repertorios de ADN, PB y célula).

Ejemplo 4.3. El refuerzo celular tras la inmunización genética genera un repertorio de Nanobody diferente.

Se identificaron a partir de las llamas 391, 395, 396 y 397, 29 familias de Nanobody específicas de CXCR7 que consistían en 55 variantes de secuencia de Nanobody (de 234 secuenciadas). Pudieron identificarse dos familias que contenían como mínimo 1 variante idéntica tanto en el repertorio de ADN como el de PB de la llama 396, al contrario de los hallazgos en los ejemplos 2 (CXCR4) y 3 (P2X7). Sólo para 2 de estas 29 familias (el 7% de la diversidad de familia total), se identificaron variantes de Nanobody que pertenecían a la misma familia a partir de la biblioteca de "ADN" y "PB" (tabla 4.1 y figura 4.3), sugiriendo de nuevo que el repertorio de Nanobody después de la vacunación con ADN (ADN) o el refuerzo celular (PB) es diferente. Sólo inmunización genética da como resultado un repertorio de Nanobody diferente, indicando que una parte del repertorio no se identifica o se pierde después del refuerzo celular.

REIVINDICACIONES

1. Método para la generación de secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a un antígeno transmembrana que comprende las etapas de:
 - a) vacunación genética de un camélido con un ácido nucleico que codifica para dicho antígeno transmembrana o un dominio o parte específica de dicho antígeno transmembrana;
 - b) refuerzo del animal con dicho antígeno en su conformación natural seleccionado de células que comprenden células naturales o transfectadas que expresan el antígeno transmembrana, extractos de membrana derivados de células, vesículas o cualquier otro derivado de membrana que alberga antígeno enriquecido, liposomas, o partículas de virus que expresan el antígeno transmembrana, y
 - c) examen de un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina derivadas de dicho camélido para secuencias de inmunoglobulina que pueden unirse a dicho antígeno transmembrana, en el que las secuencias de inmunoglobulina son secuencias de V_{HH} ; y en el que dicho antígeno transmembrana es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) o un canal iónico.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho camélido es llama o alpaca.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además humanizar dichas secuencias de V_{HH} .
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la vacunación se realiza mediante una inyección de chorro sin aguja, mediante un método balístico, mediante inyecciones mediadas por aguja, mediante aplicación tópica o mediante cualquier método de administración de ADN seguido por electroporación *in vivo*.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la vacunación se realiza mediante administración intradérmica, intramuscular o subcutánea de ADN.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina se obtiene de la sangre, ganglio linfático, bazo, médula ósea o cualquier tejido que alberga células que codifican para estas secuencias de inmunoglobulina de dicho camélido.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho antígeno transmembrana se expresa en cualquier célula que permite la expresión de la diana en su conformación nativa.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha célula se examina de Cho, Cos7, Hek293 o células derivadas de camélidos.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha célula derivada de camélido es una célula derivada de llama o derivada de alpaca.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antígeno transmembrana es un receptor acoplado a proteína G (GPCR).
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antígeno se selecciona de CXCR7, CXCR4 y P2X7.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de inmunoglobulina se expresa en un conjunto, colección o muestra de células o virus y dicho conjunto, colección o muestra de células se examina para células que expresan una secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno transmembrana.
13. Método según la reivindicación 12, en el que una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno transmembrana se purifica y/o se aísla de la célula o virus, seguido por expresión de dicha secuencia de inmunoglobulina.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la secuencia de inmunoglobulina que puede unirse a dicho antígeno transmembrana se purifica y/o se aísla.

Figura 1.1. Panel A

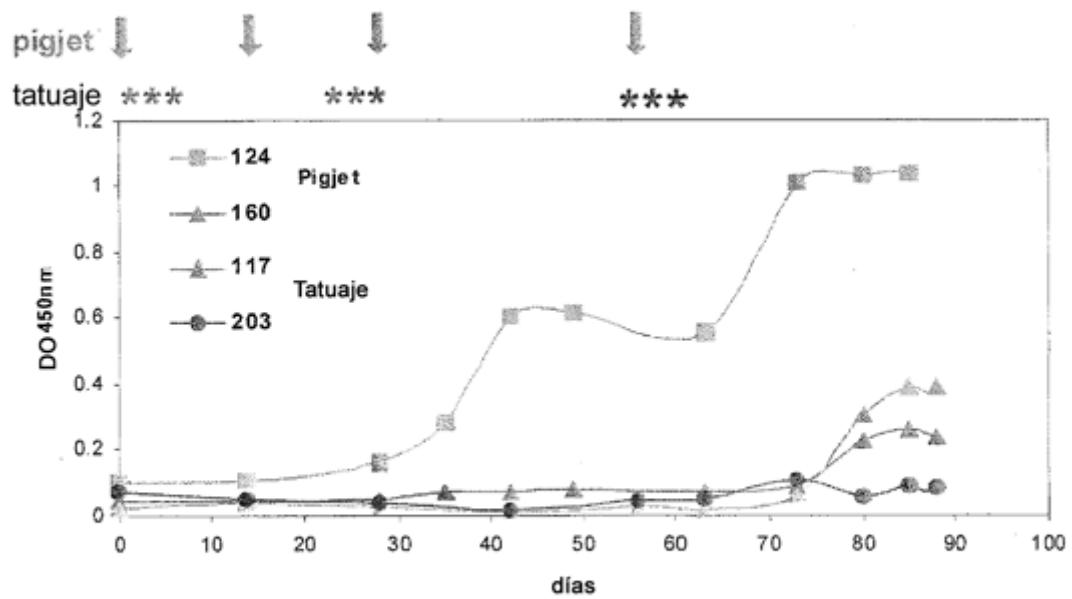


Figura 1.1. Panel B

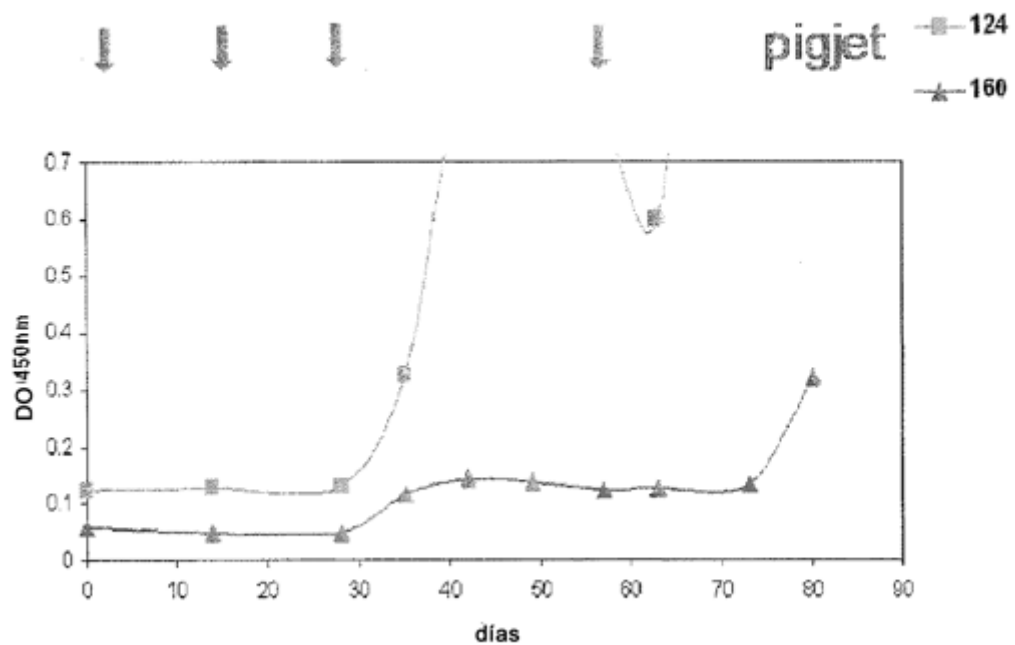


Figura 1.1 Panel C

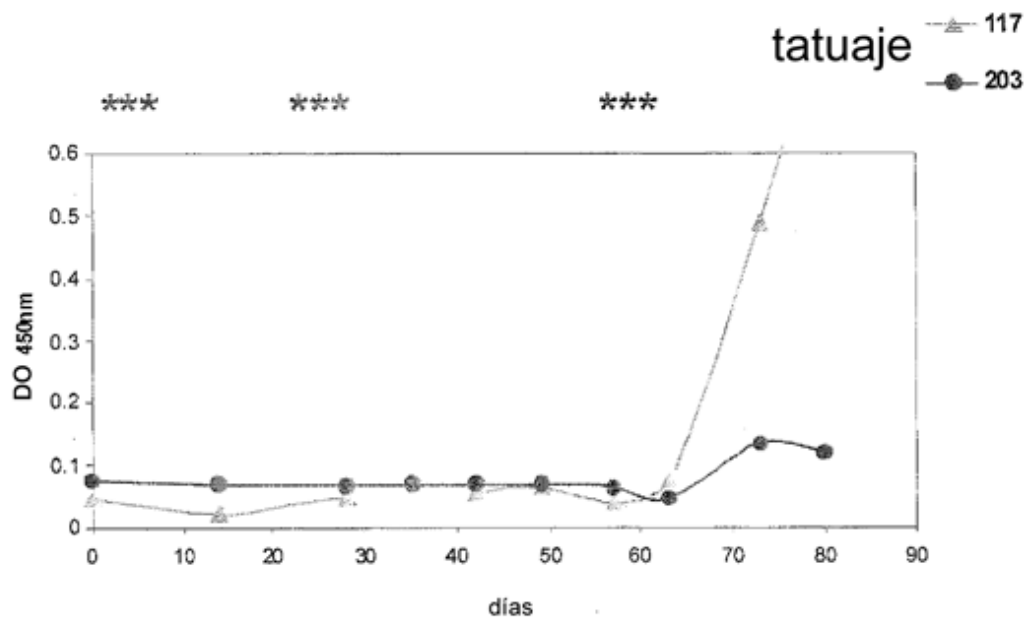


Figura 1.2

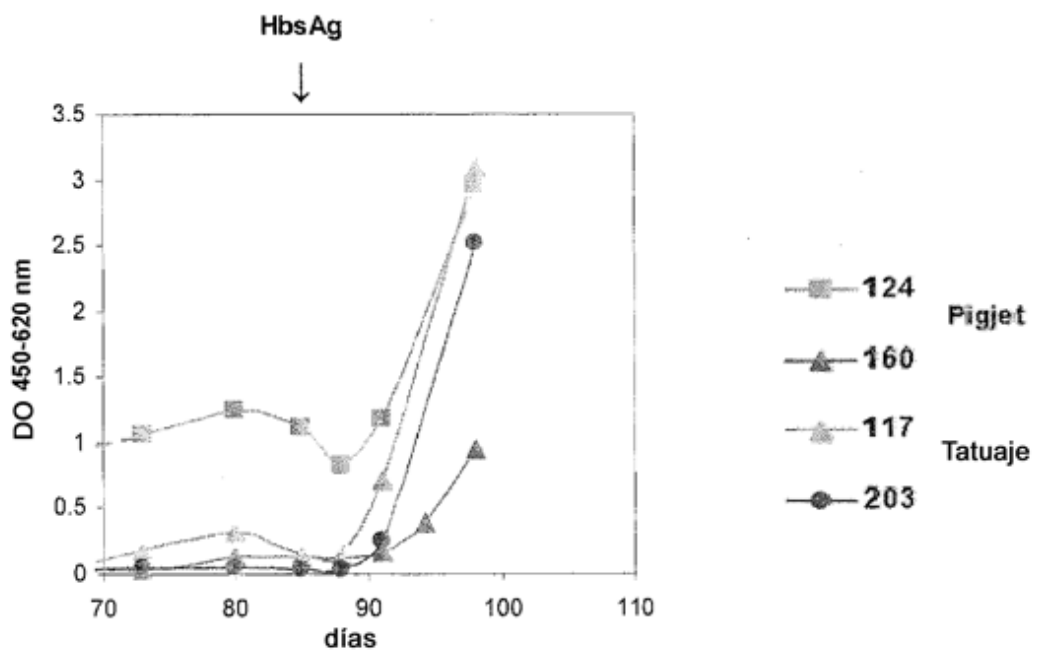


Figura1.3.

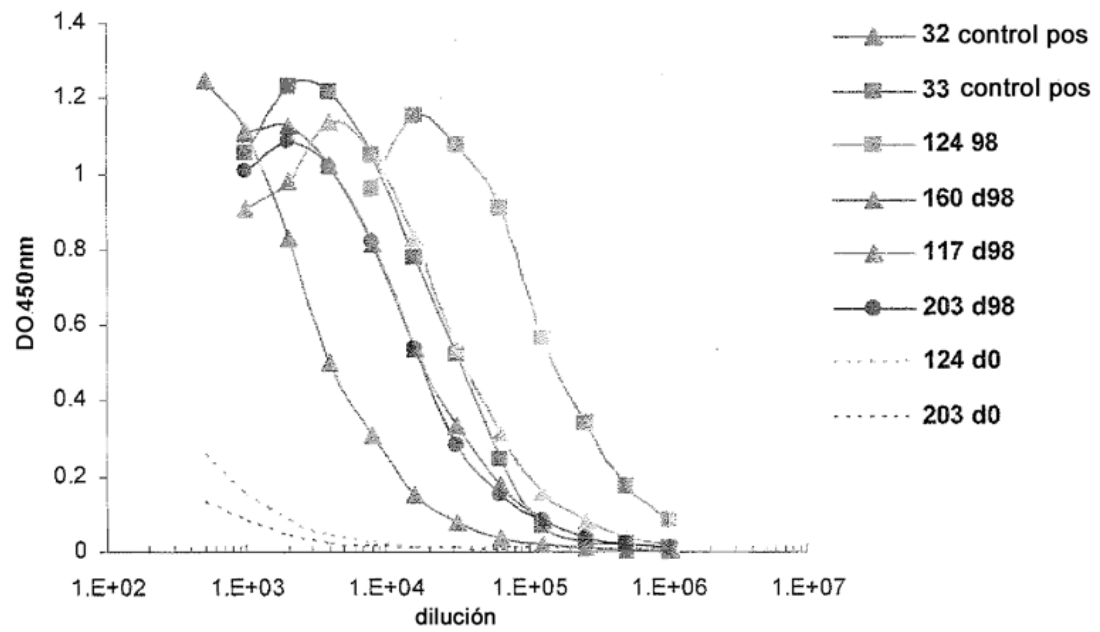


Figura 1.4.

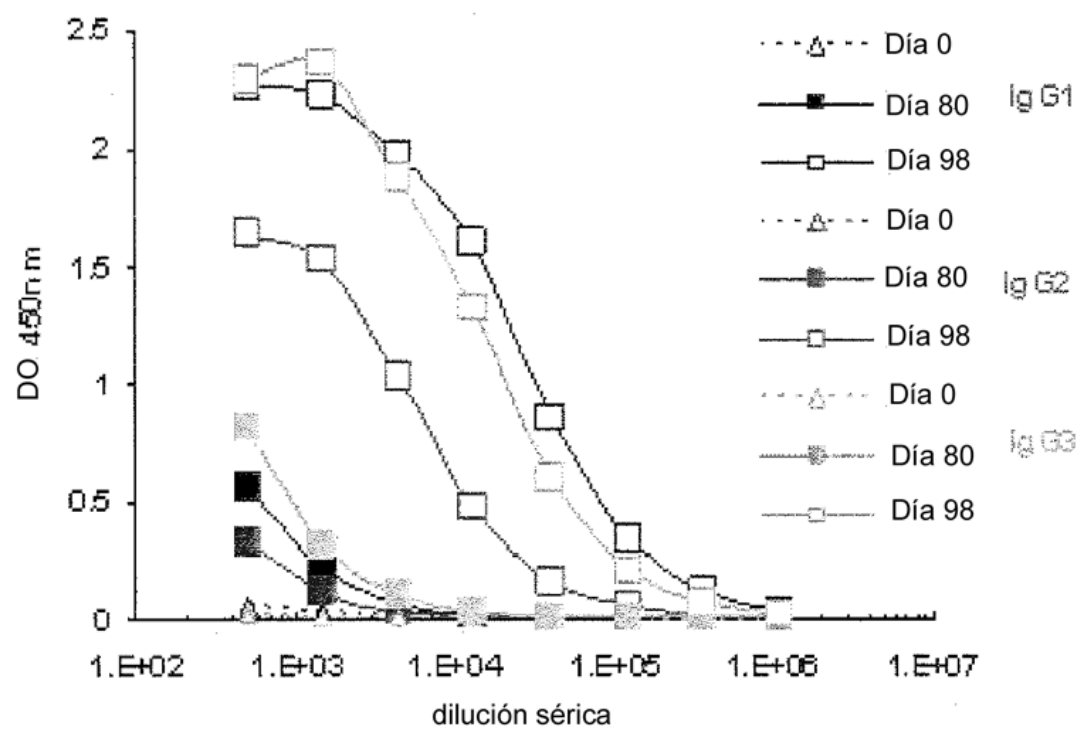


Figura 2.1.

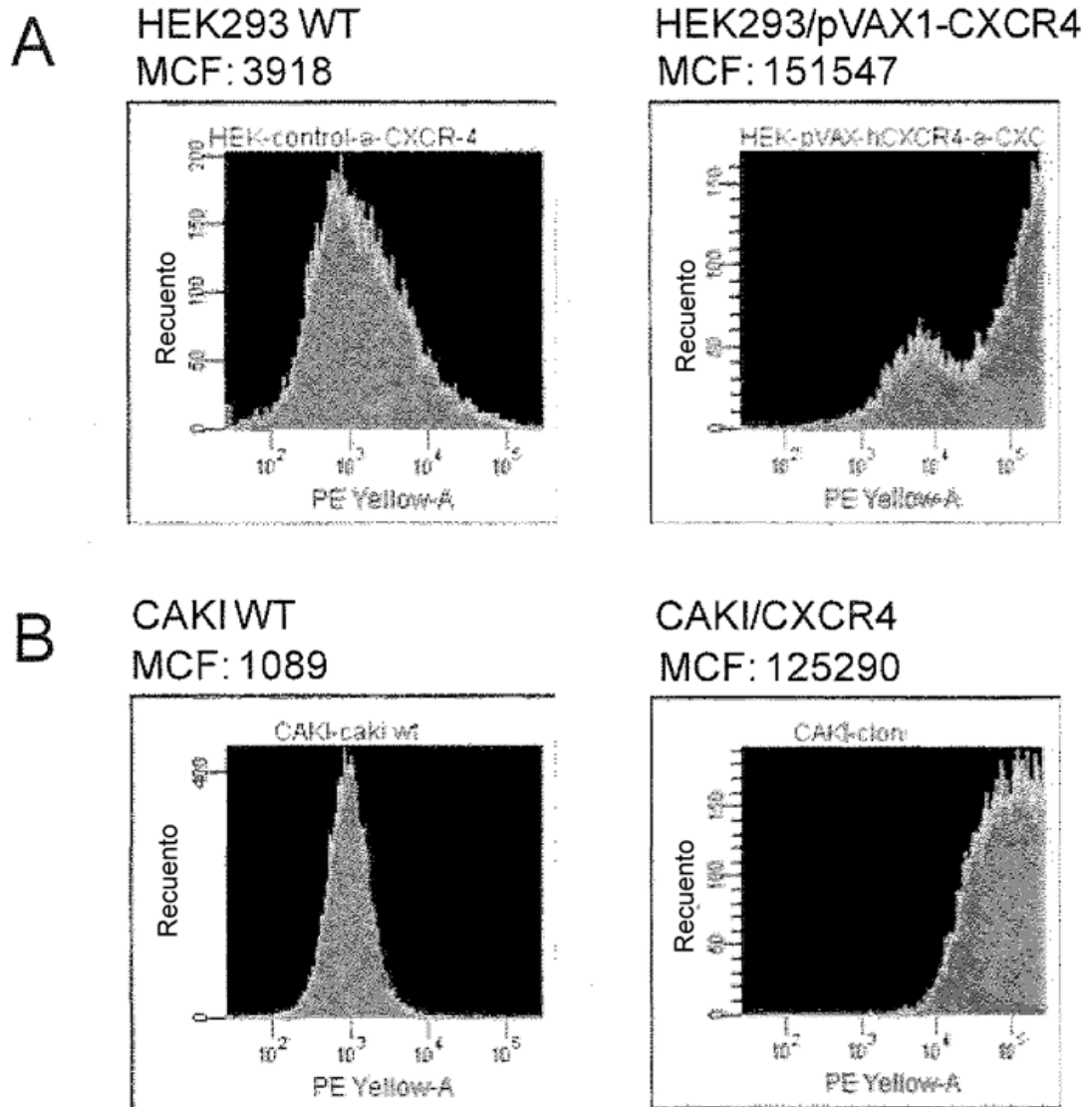


Figura 2.2. Panel A

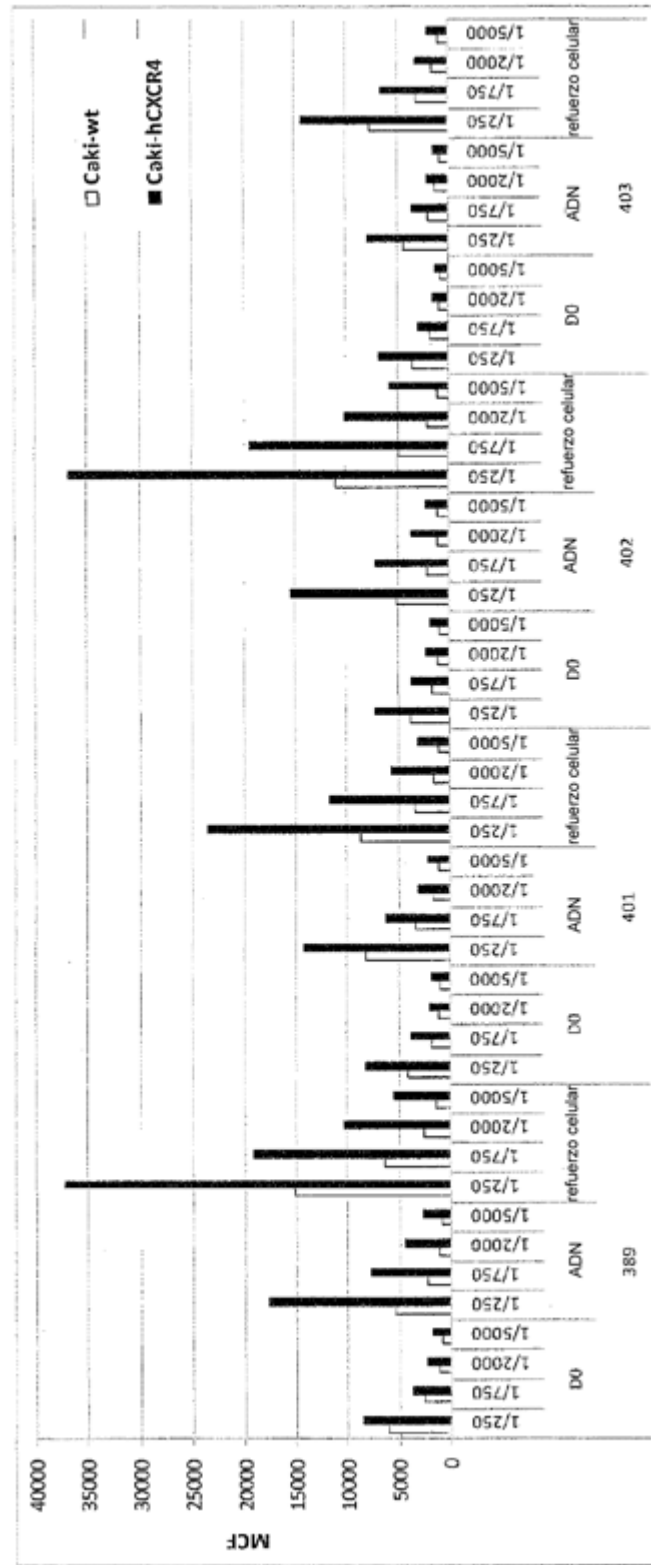


Figura 2.2 Panel B

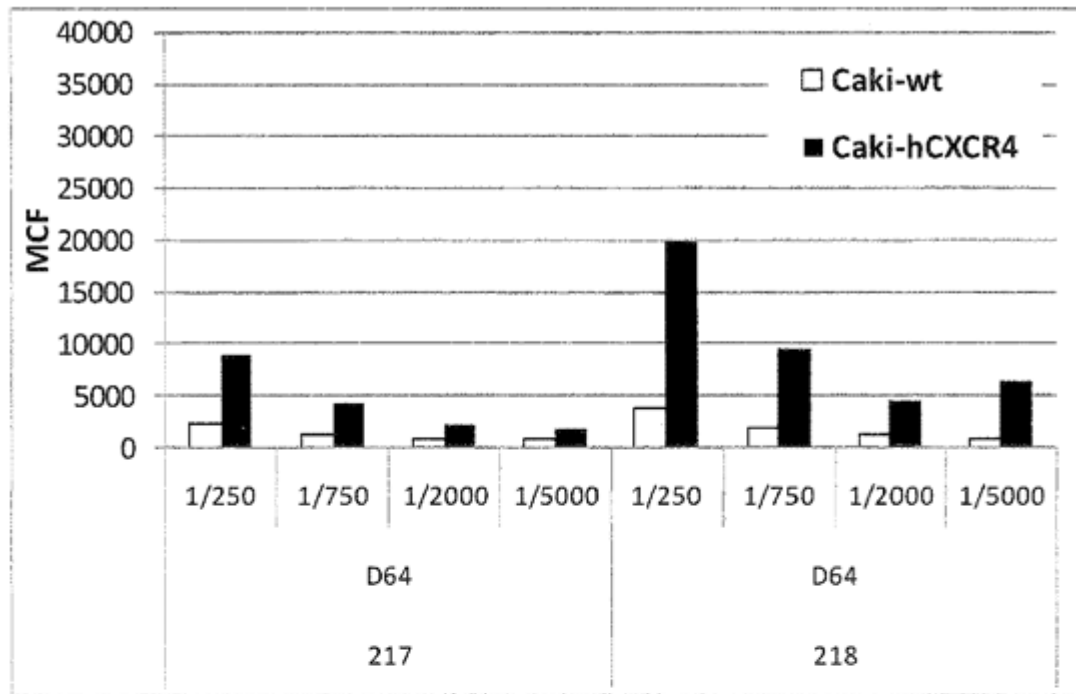


Figura 2.3

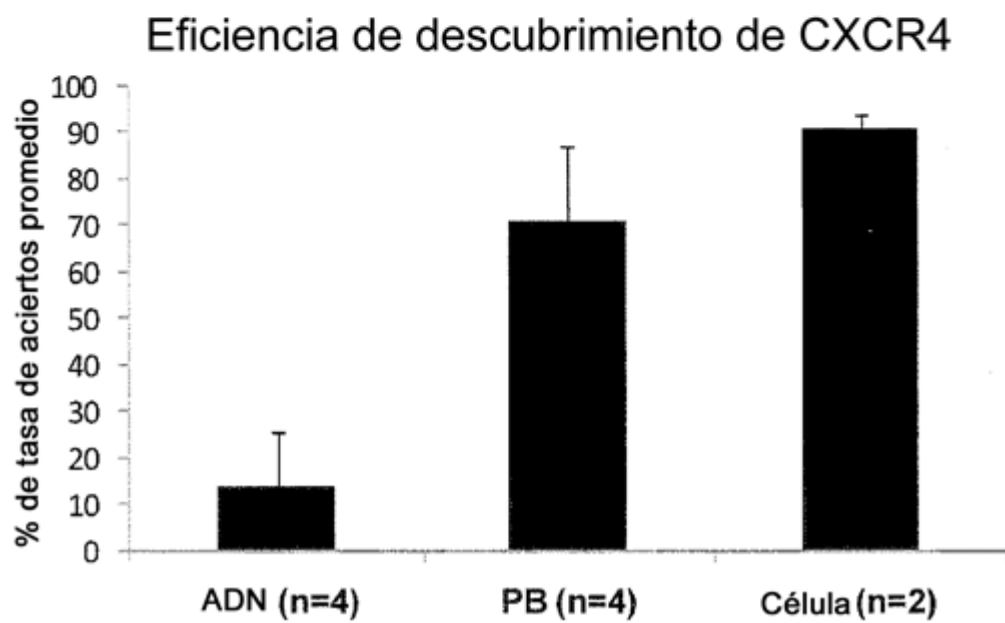


Figura 2.4.

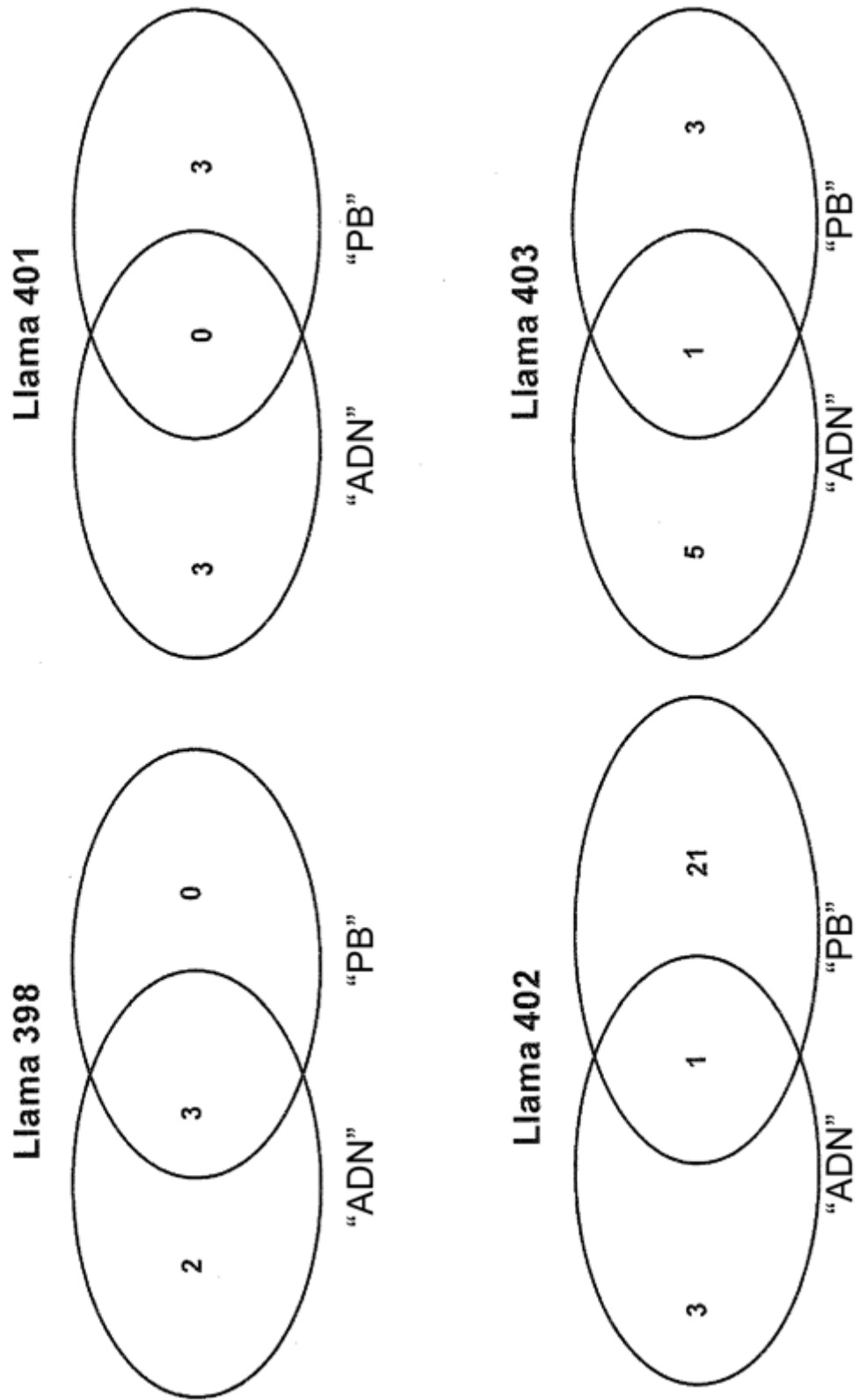


Figura 2.5. Panel A

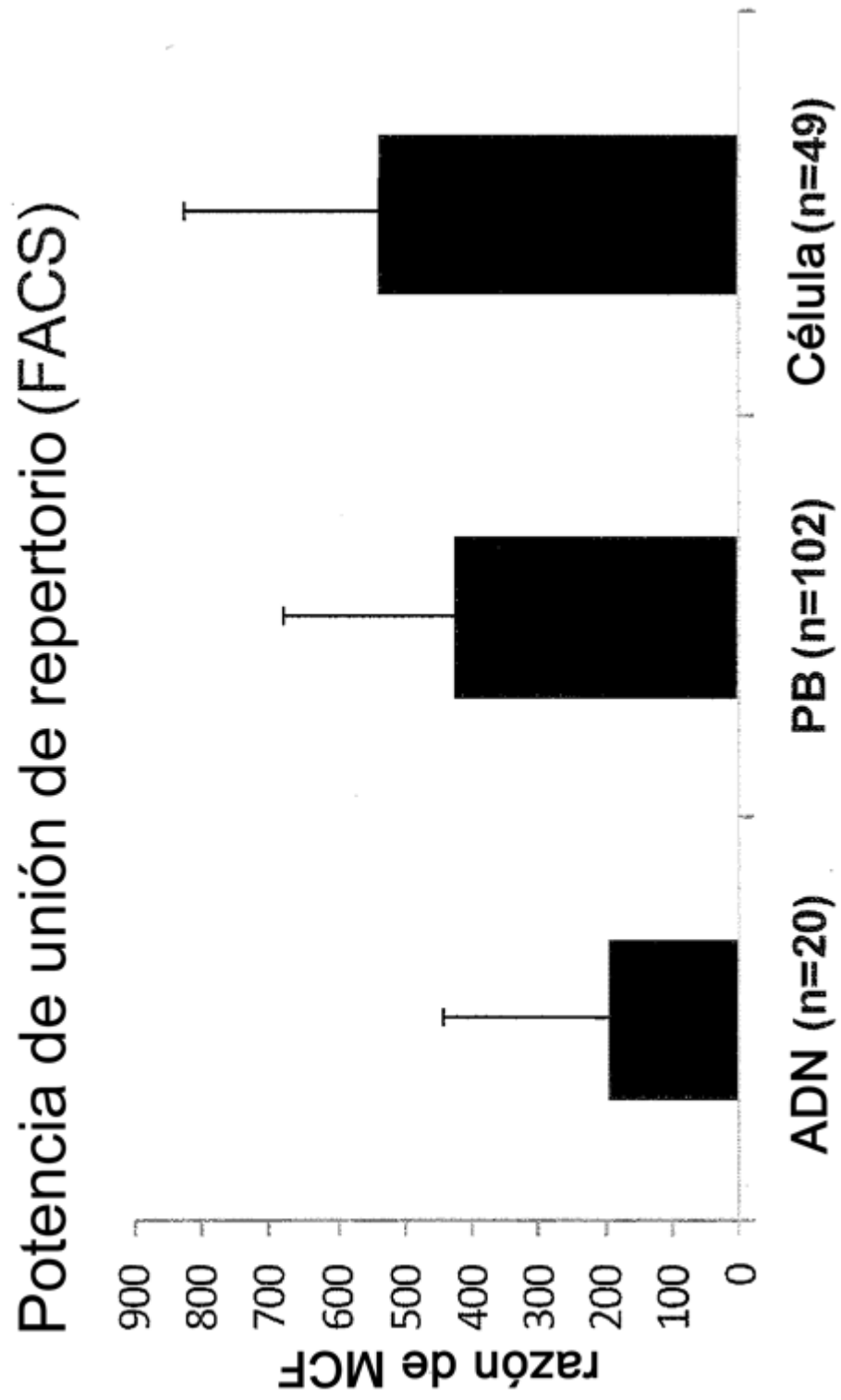


Figura 2.5. Panel B

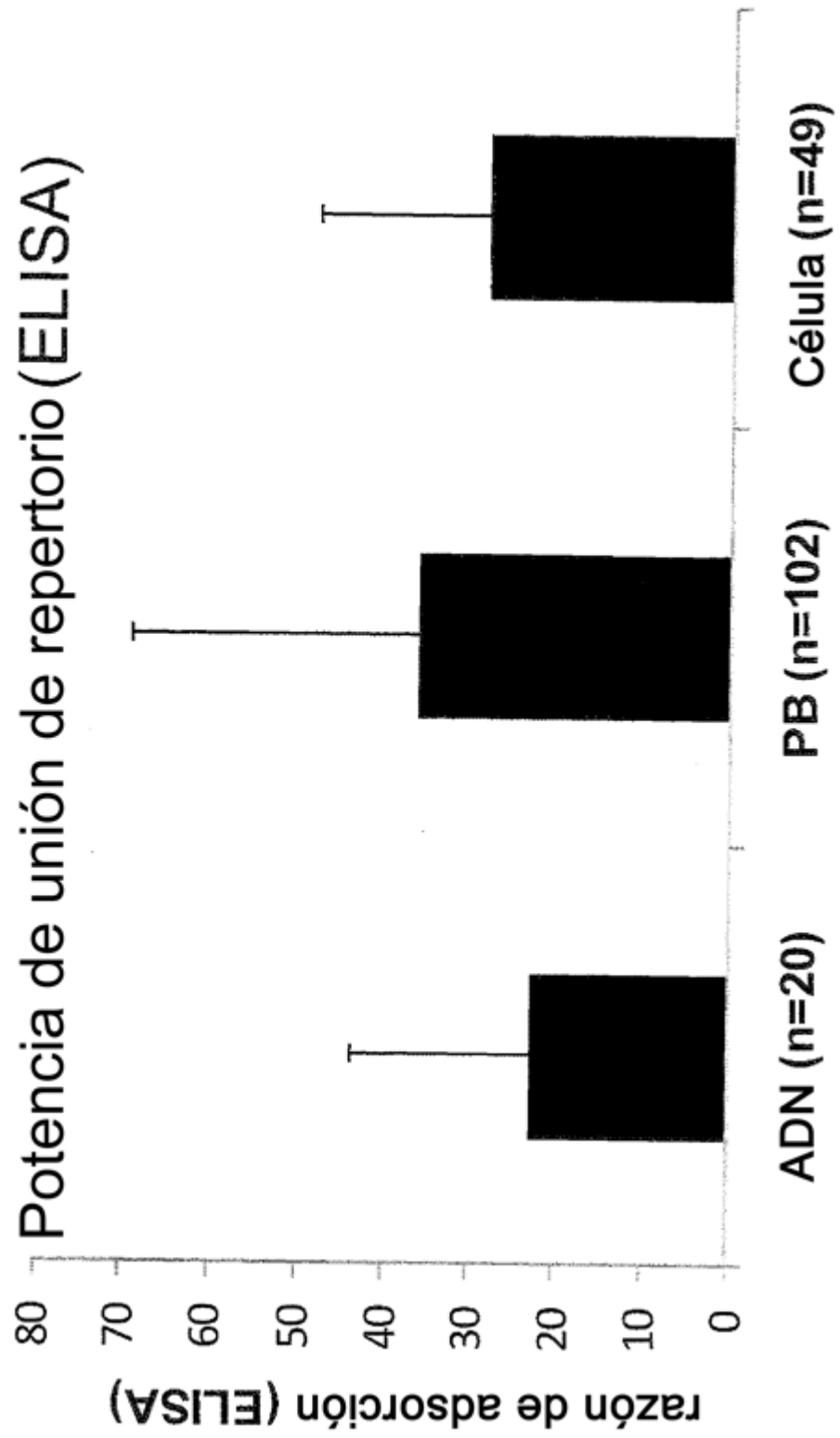


Figura 3.1.

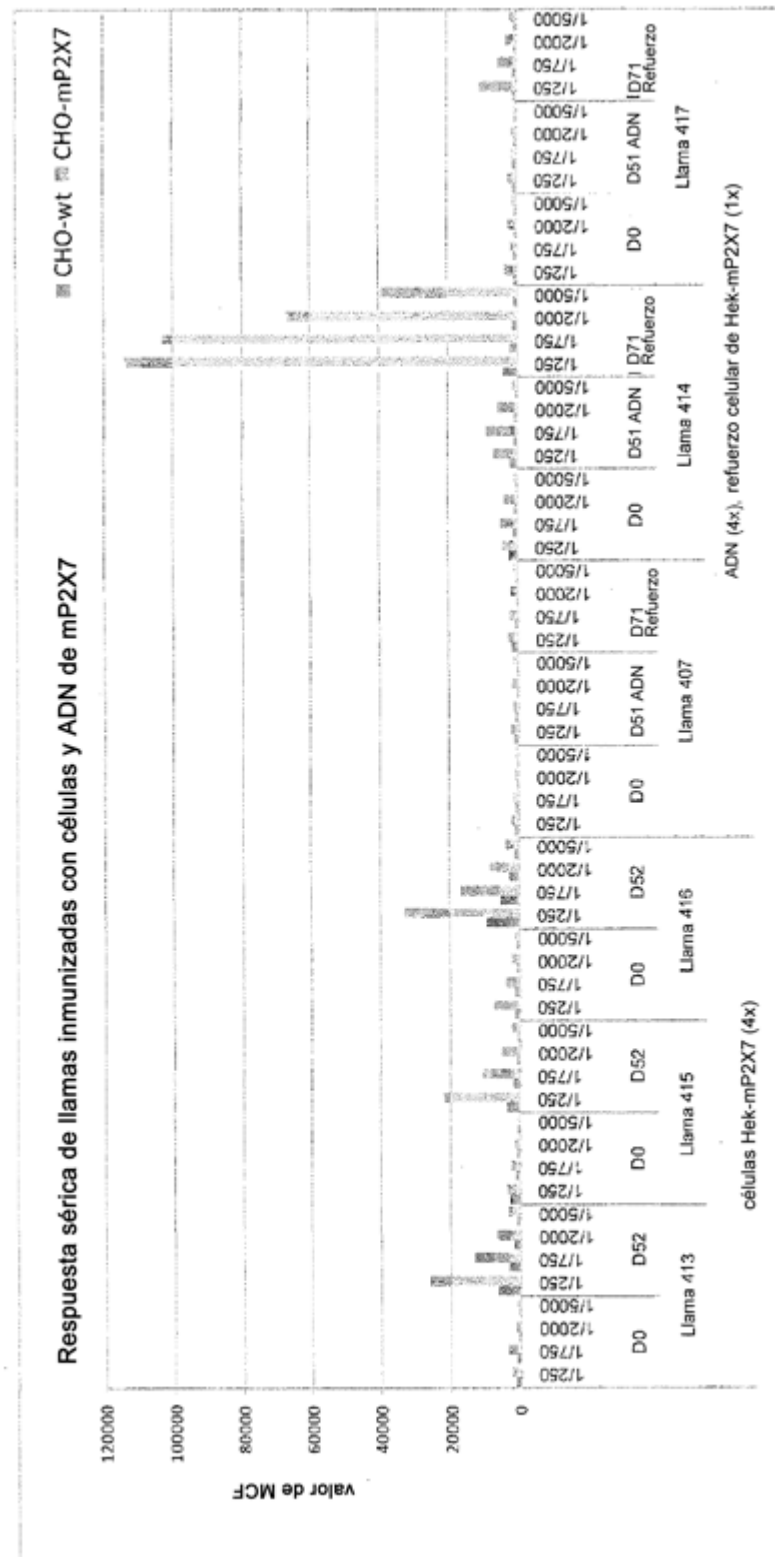


Figura 3.3.

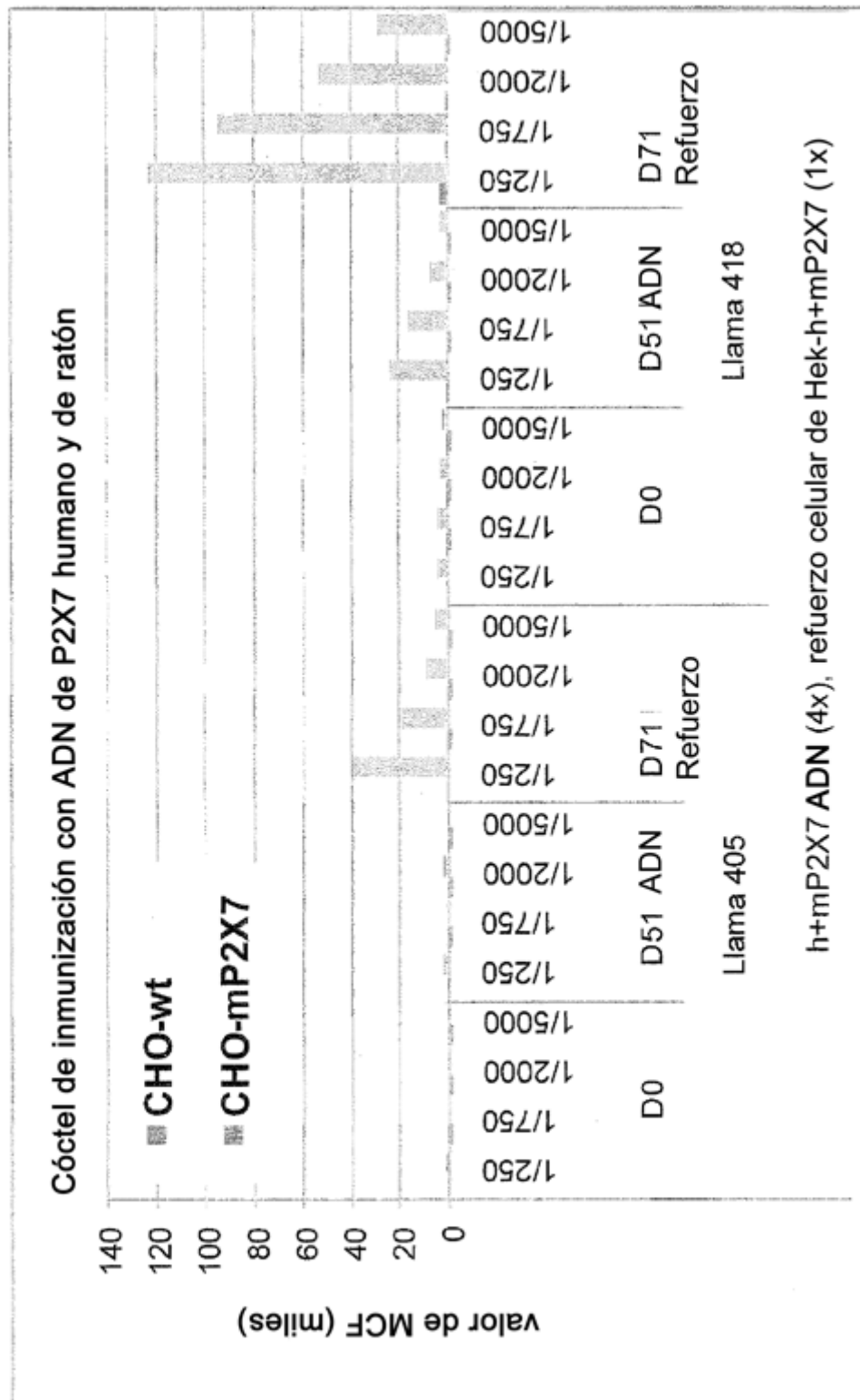
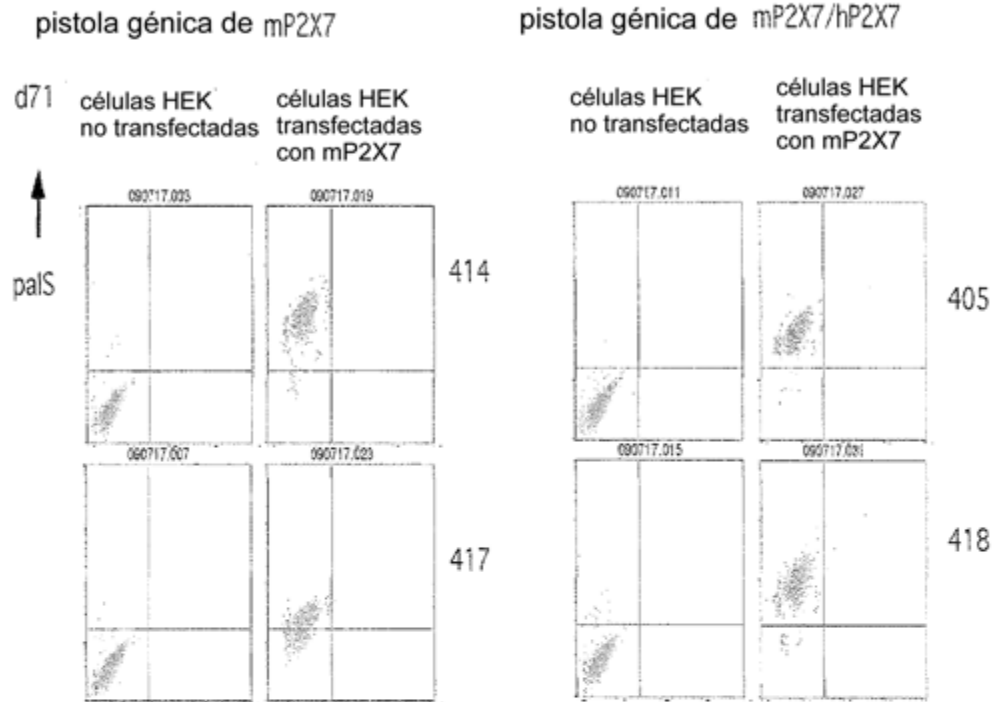


Figura 3.4. A

anti-IgG-1 de llama



d67 ' antes del refuerzo con células HEK

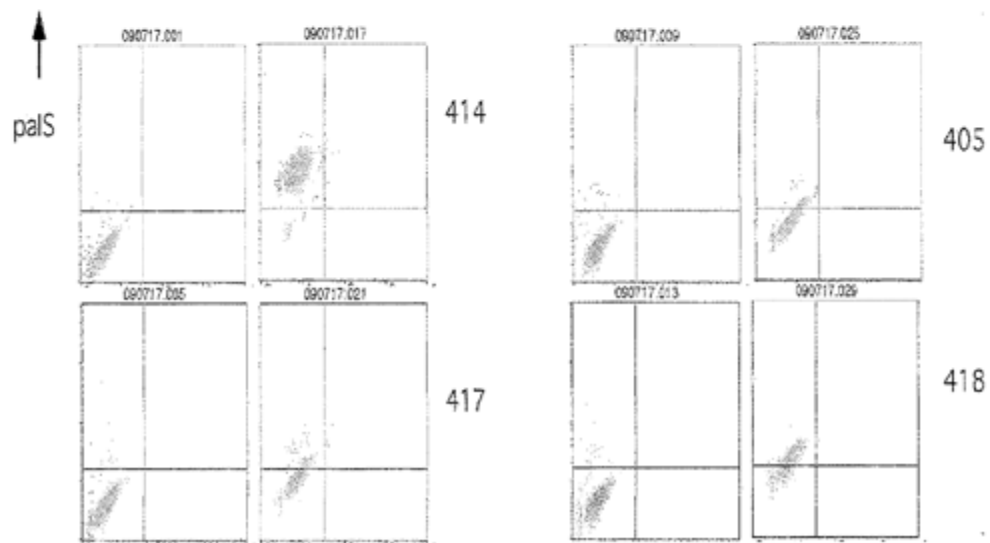


Figura 3.4. B

anti-IgG-2/3 de llama

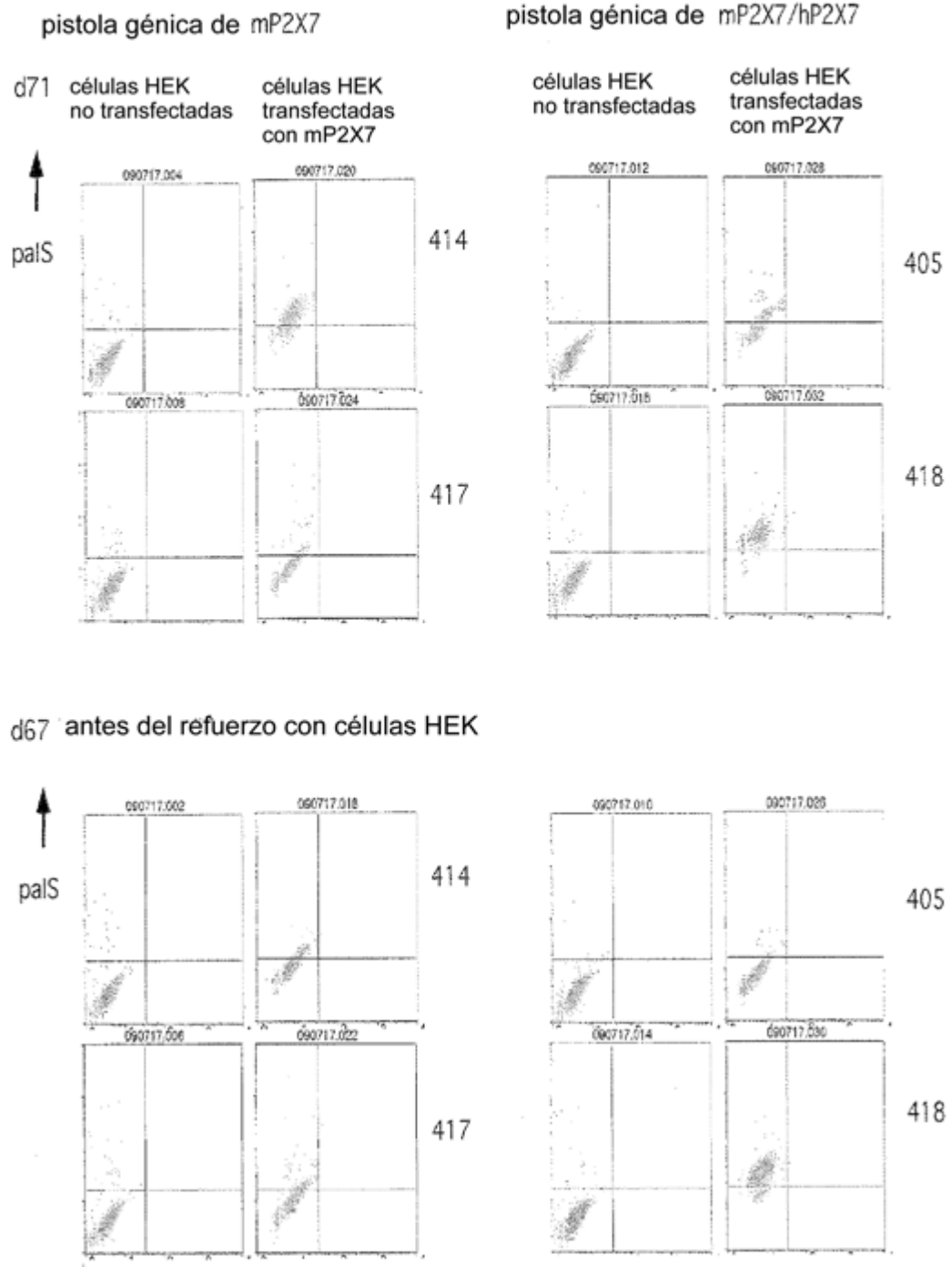


Figura 3.5.

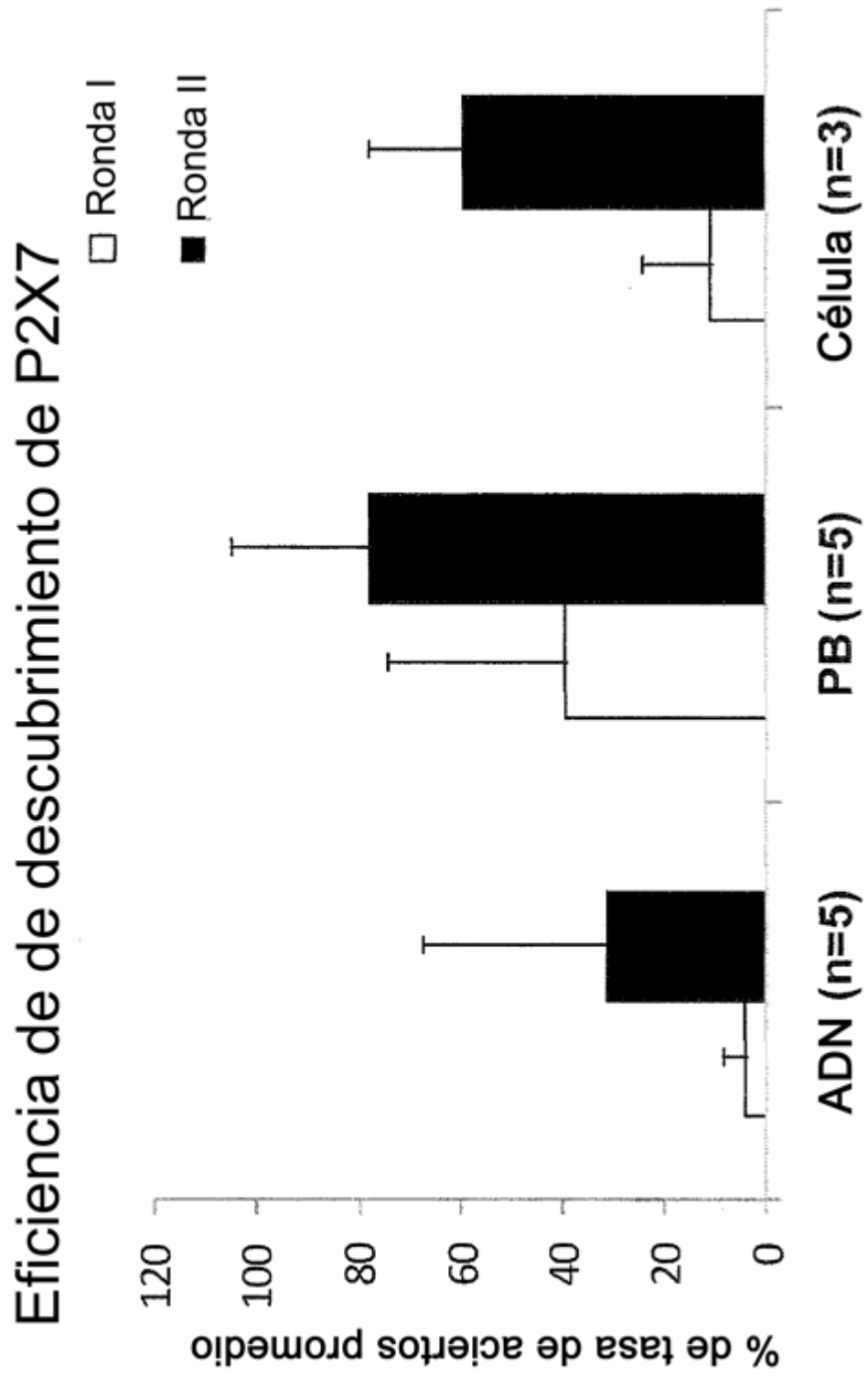


Figura 3.6.

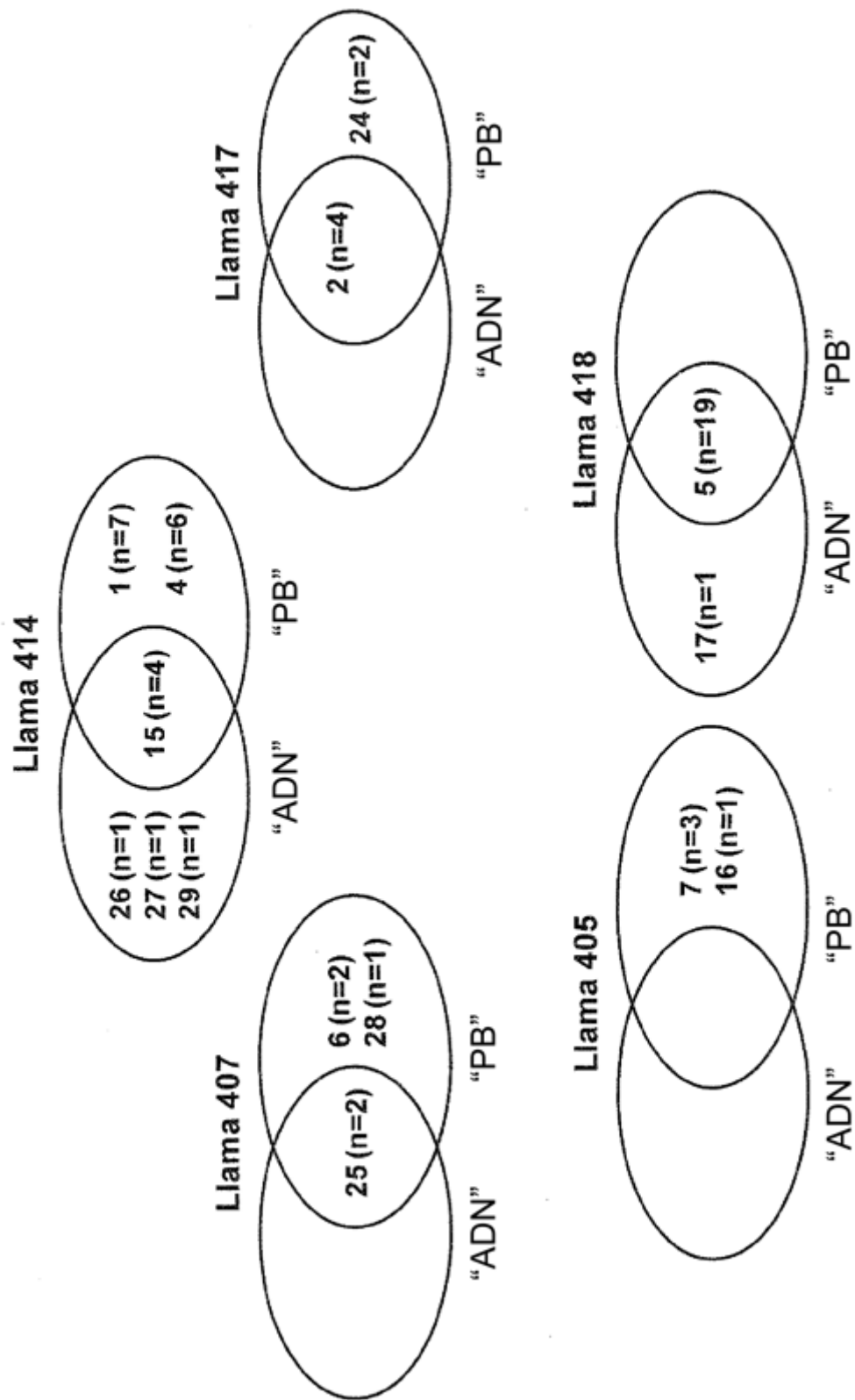


Figura 3.7.

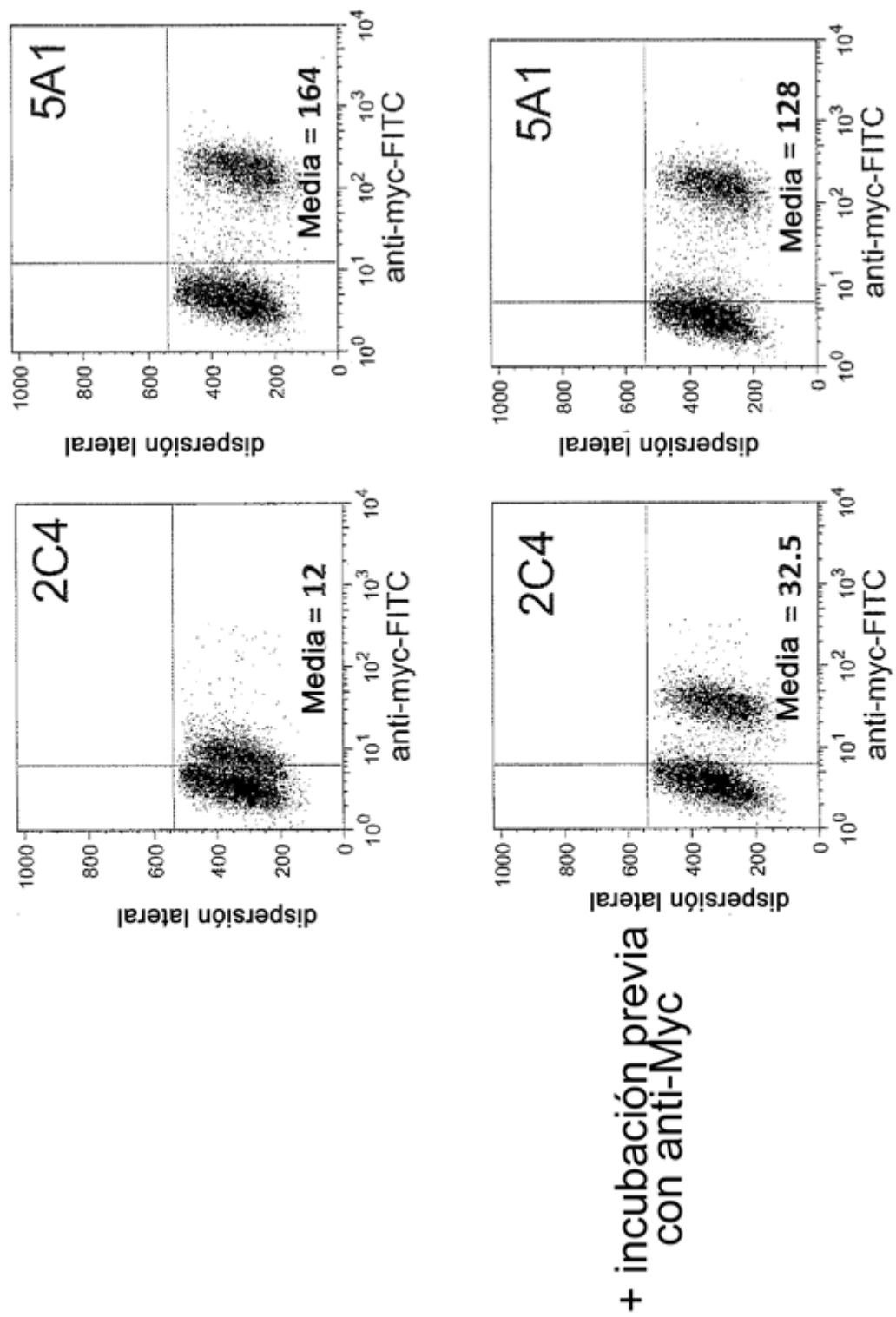


Figura 3.8.

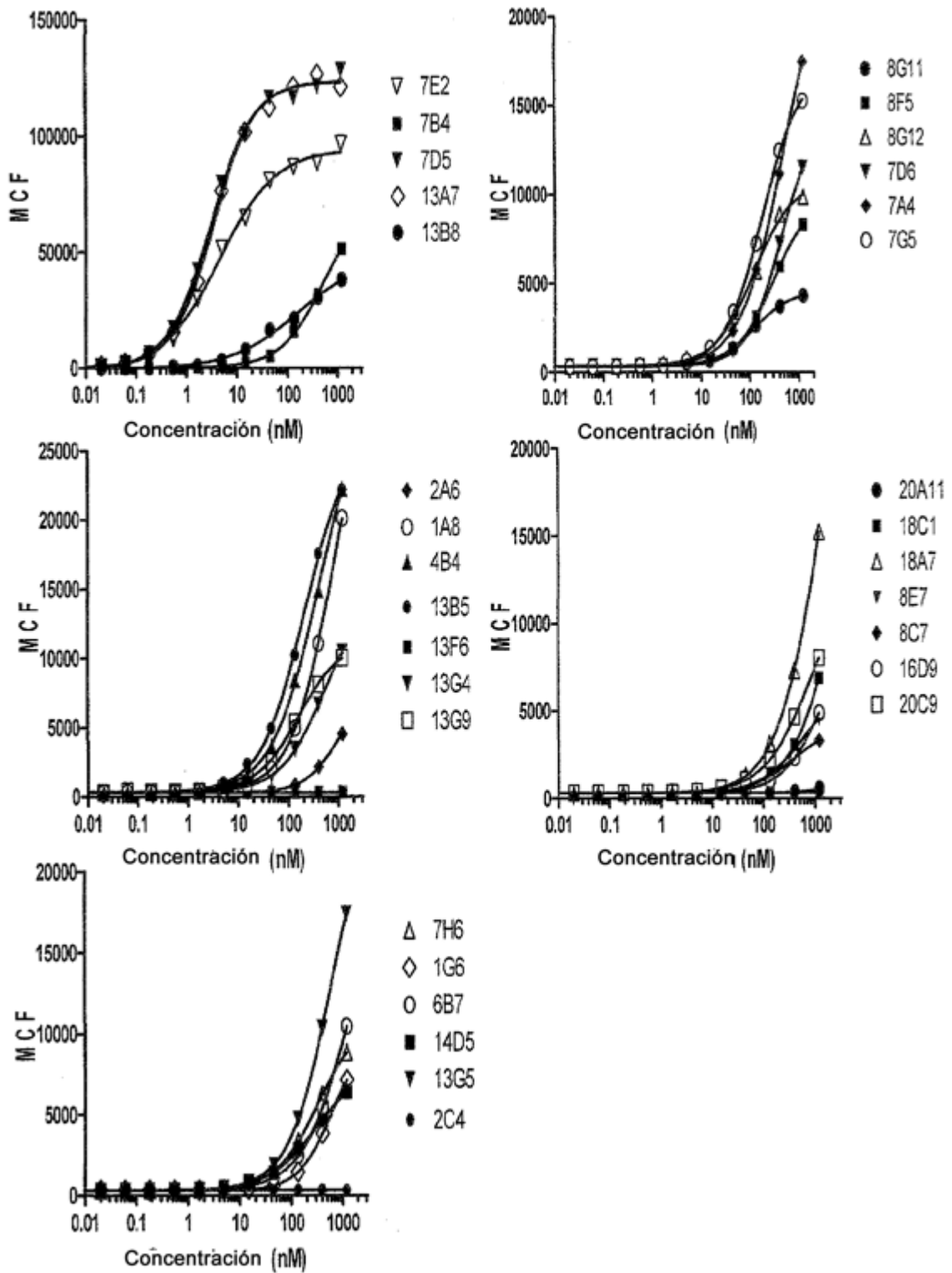


Figura 3.9.

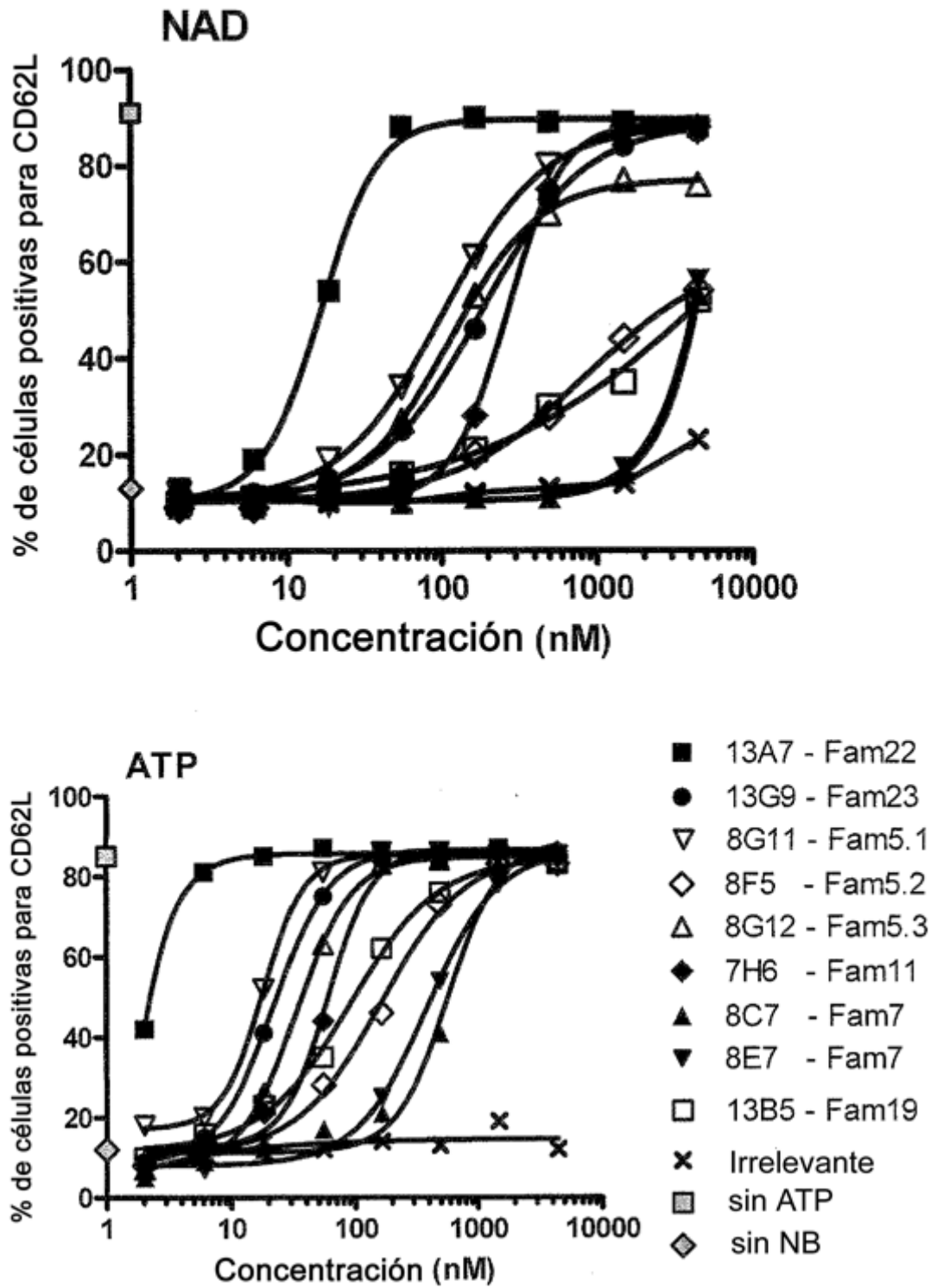


Figura 3.10. Panel A/B

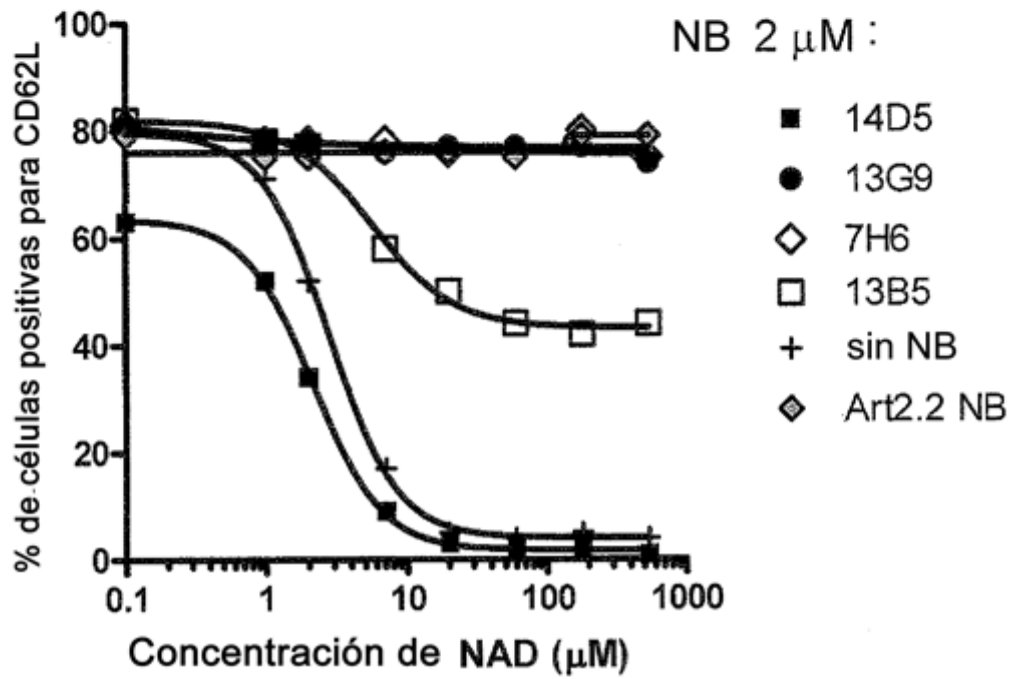
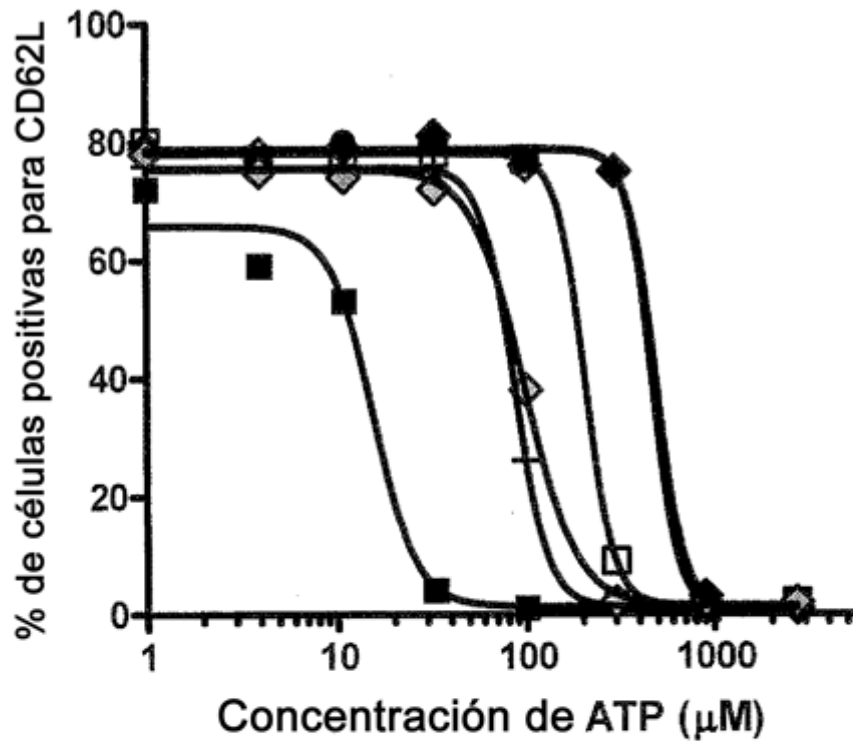


Figura 3.10. Panel C/D

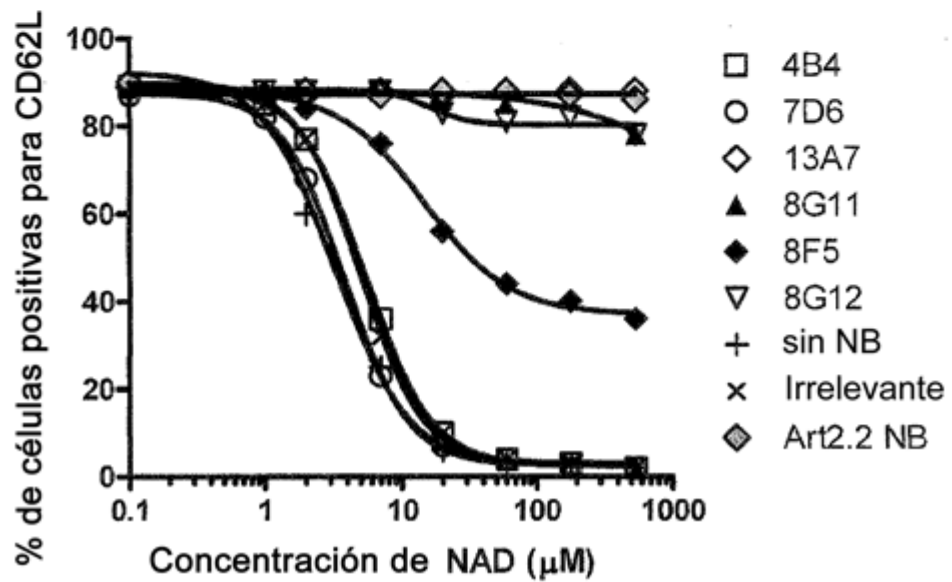
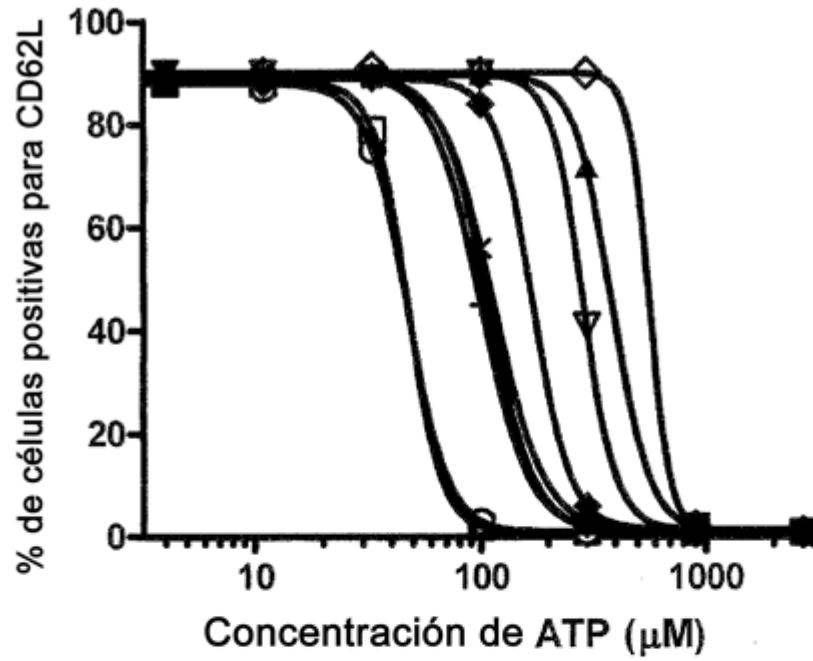


Figura 3.11. Panel A/B

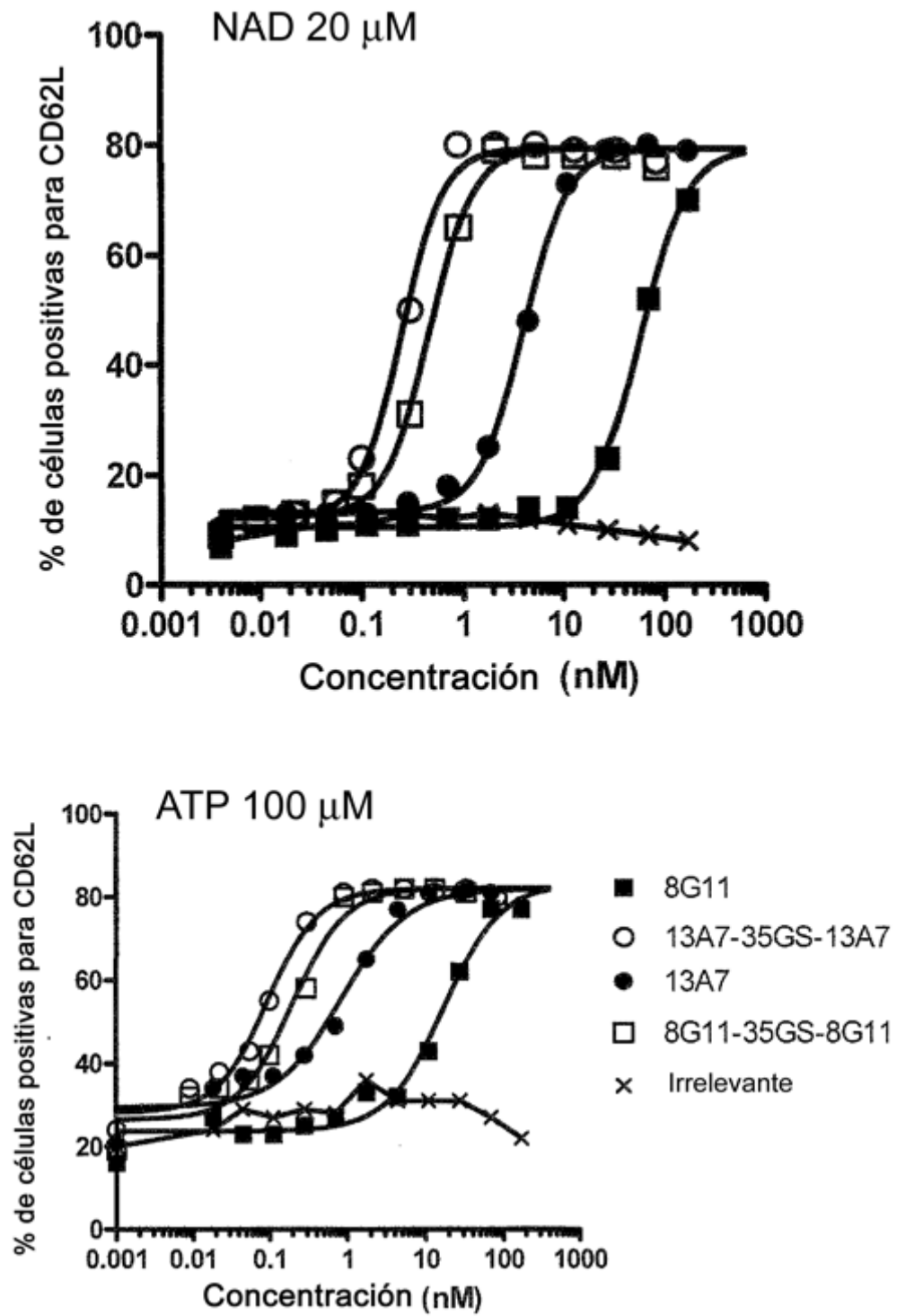


Figura 3.11. Panel C/D

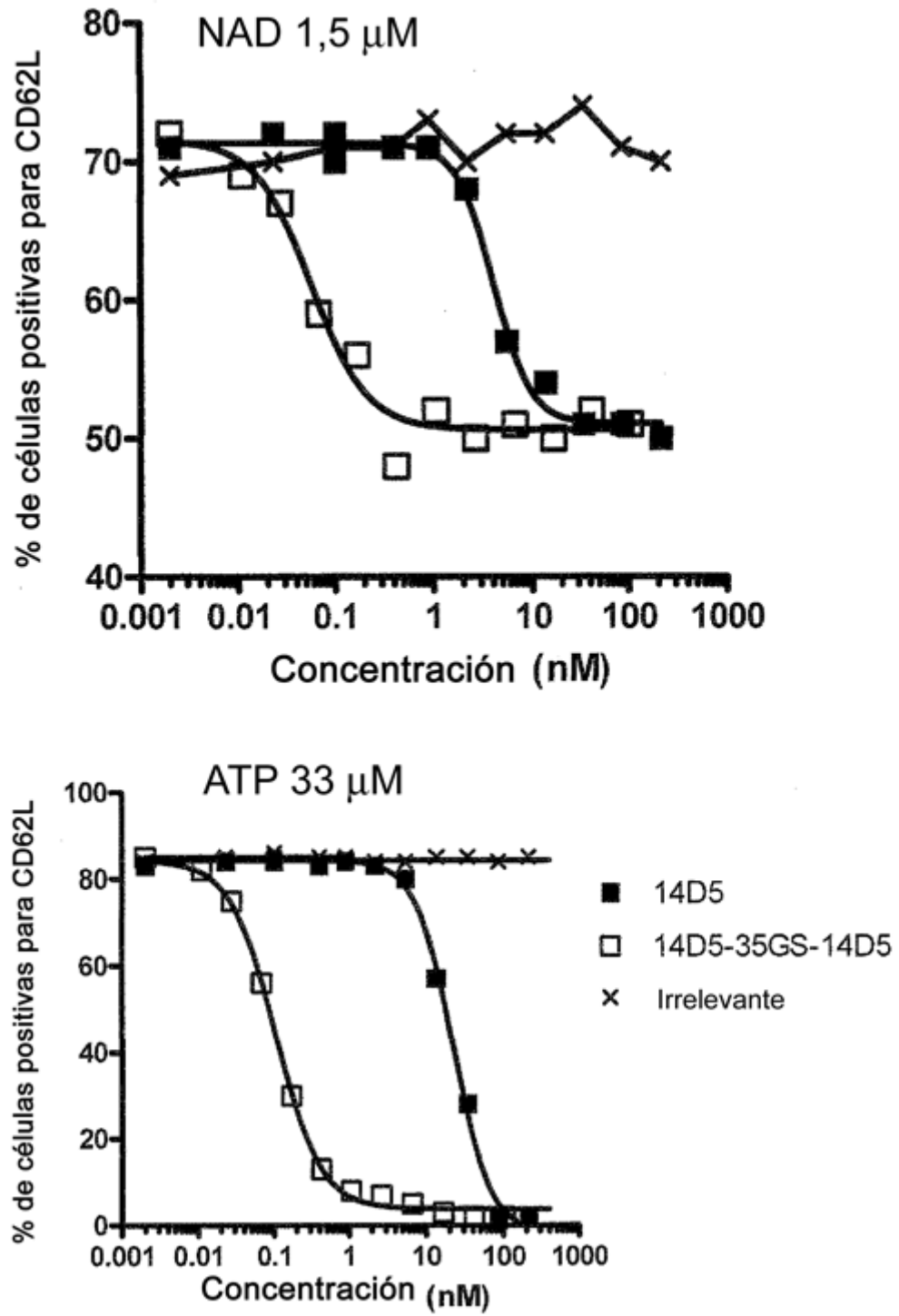
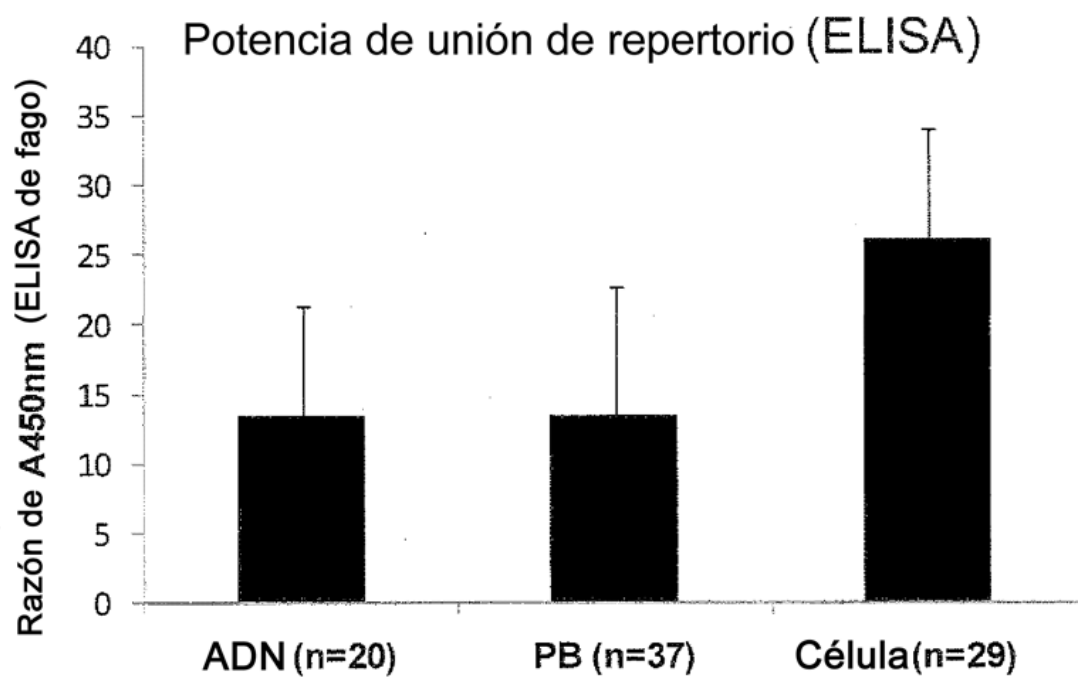


Figura 3.12.



7	P2X7/PM18D12	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	121
7	P2X7/PM18D4B3	a	r	slamg	er	gtspggtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	121
7	P2X7/PM18C67	a	r	slamg	er	gtspggtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	124
8	P2X7/PM18E87	a	r	sspgv	er	atissngvthlyadvskg	a	p	stsssvlprvryqvs	q	126
8	P2X7/PM18D17	a	r	sspgv	er	atissngvthlyadvskg	a	p	stsssvlprvryqvs	q	126
8	P2X7/PM18D76	a	r	sspgv	er	atissngvthlyadvskg	a	p	stsssvlprvryqvs	q	126
9	P2X7/PM18E8	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
9	P2X7/PM18F15	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
10	P2X7/PM18F79	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
11	P2X7/PM18F7A4	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
12	P2X7/PM18F7B4	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	120
12	P2X7/PM18F7C	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	120
12	P2X7/PM18F7E	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	120
13	P2X7/PM18F7G5	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	129
13	P2X7/PM18F34	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	129
14	P2X7/PM18D8	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	126
14	P2X7/PM18E1388	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	129
15	P2X7/PM18F7D5	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	129
15	P2X7/PM18D9	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	129
15	P2X7/PM18F6	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	129
16	P2X7/PM18F193	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	122
17	P2X7/PM18F19C2	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	114
17	P2X7/PM18F6B	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	124
18	P2X7/PM18F14D5	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	125
19	P2X7/PM18F1365	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	113
20	P2X7/PM18F1365	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
21	P2X7/PM18F1385	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	127
22	P2X7/PM18F13F6	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	127
22	P2X7/PM18F13G4	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
23	P2X7/PM18F13A7	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	126
24	P2X7/PM18F1369	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	126
24	P2X7/PM18F1369	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	125
25	P2X7/PM18F20H9	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	125
25	P2X7/PM18F20A11	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	130
26	P2X7/PM18F18C1	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
27	P2X7/PM18A7	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	121
28	P2X7/PM18F19H4	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123
29	P2X7/PM18F16G3	a	r	slamg	er	gtsrrgtsttyadvskg	a	p	sevlstsvldtrglev	q	123

Figura 4.1.

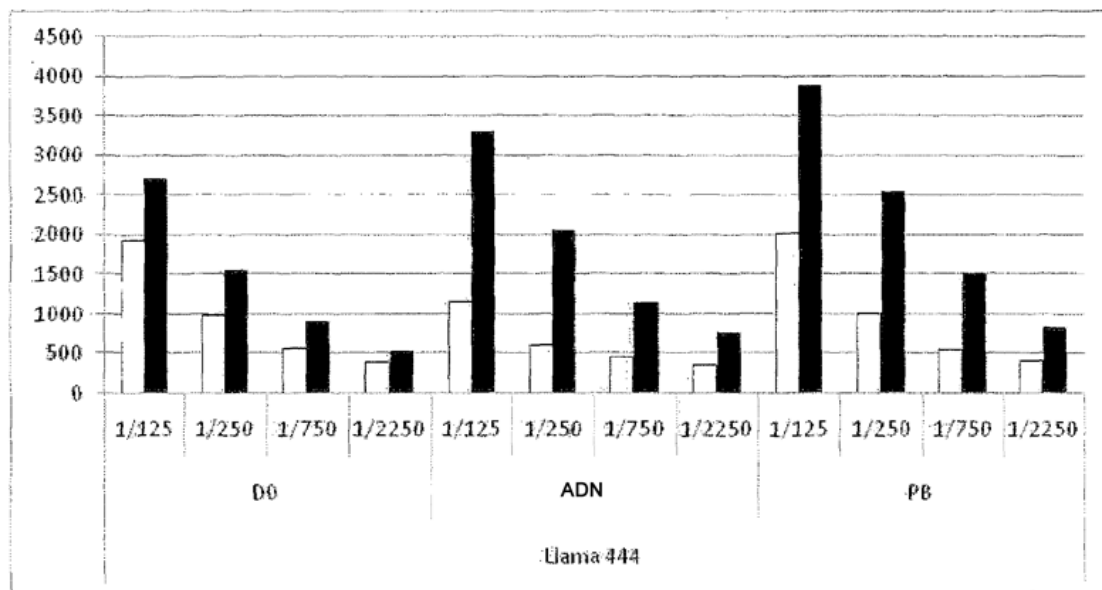


Figura 4.2.

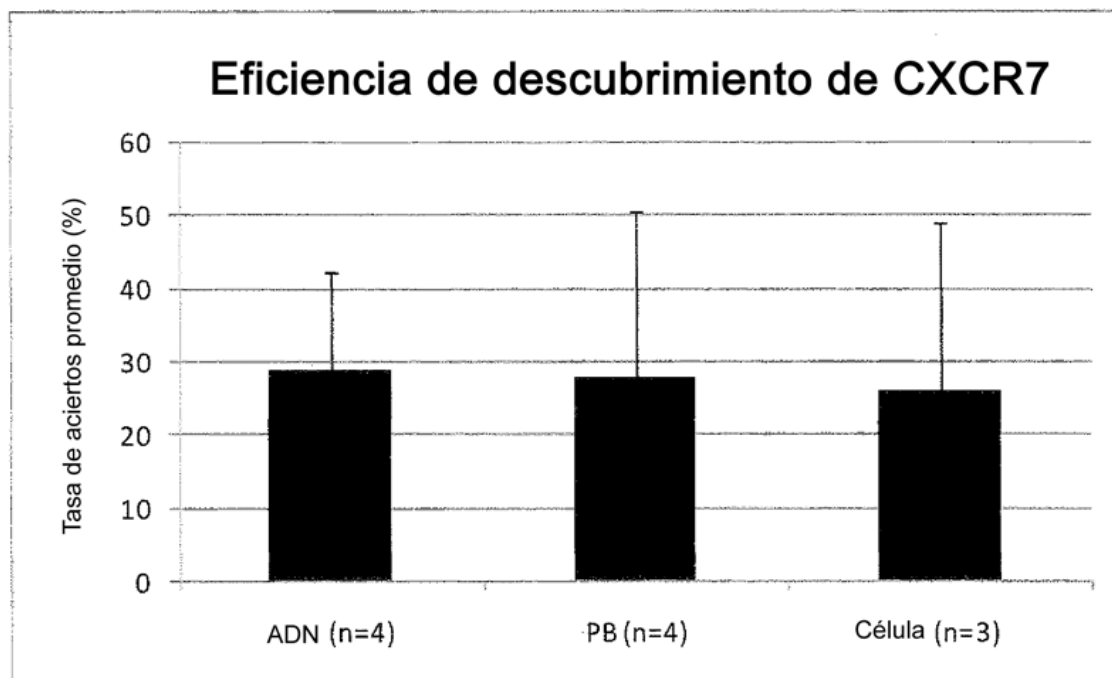


Figura 4.3.

