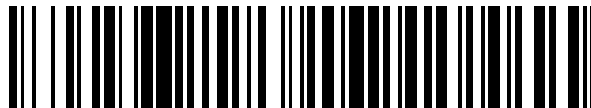


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 123**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2006 E 15172289 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2949668**

54 Título: **Nanobodies™ mejorados contra factor de necrosis tumoral alfa**

30 Prioridad:

**18.05.2005 US 682332 P**

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

**07.08.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEIRNAERT, ELS ANNA ALICE**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**Observaciones :**

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

**ES 2 778 123 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

Nanobodies™ mejorados contra factor de necrosis tumoral alfa

5 La presente invención se refiere a Nanobodies™ (nanocuerpos) mejorados contra factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) así como a polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más de tales nanocuerpos. [Nota: Nanobody™, Nanobodies™ y Nanoclone™ son marcas registradas de Ablynx N.V.]

10 La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican para tales nanocuerpos y polipéptidos; a métodos para preparar tales nanocuerpos y polipéptidos; a células huésped que expresan o son capaces de expresar tales nanocuerpos o polipéptidos; a composiciones que comprenden tales nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped; y a usos de tales nanocuerpos, tales polipéptidos, tales ácidos nucleicos, tales células huésped o tales composiciones, en particular con propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, tales como los propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico mencionados a continuación.

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

20 El documento WO 04/041862 del solicitante se refiere a nanocuerpos contra TNF-alfa y a la preparación y uso de los mismos, en particular para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con y/o mediados por TNF-alfa, tales como inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, diabetes tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

30 Los nanocuerpos anti-TNF según el documento WO 04/041862 pueden ser humanizados y pueden ser monovalentes o multivalentes, estos últimos conducen a un aumento de la afinidad por TNF. Los Nanobodies™ anti-TNF según el documento WO 04/041862 también pueden ser multiespecíficos, y pueden estar en particular en forma de un constructo multiespecífico que comprende dos o más nanocuerpos contra TNF y un nanocuerpo adicional dirigido contra una proteína sérica tal como albúmina sérica humana, lo cual conduce a un aumento de la semivida *in vivo*.

35 El documento WO 04/041862 también se refiere a métodos para la preparación de los nanocuerpos anti-TNF, a ácidos nucleicos o a constructos que codifican para los nanocuerpos anti-TNF, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden los nanocuerpos anti-TNF, que pueden ser adecuadas para la administración intravenosa, subcutánea, oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal o rectal, o para la administración por inhalación. Los nanocuerpos anti-TNF según el documento WO 04/04 1862 también pueden usarse con propósitos de diagnóstico, opcionalmente en forma de un kit de partes.

40 El documento EP 0 486 526 describe ligandos de unión a TNF-alfa contra un epítipo específico de TNF. Entre los ligandos de unión, se mencionan anticuerpos de dominio simple ("dAb").

45 Reiter *et al.*, J. Mot. Biol. (1999), 290, 685-698 describen anticuerpos de dominio único contra TNF-alfa obtenidos a partir de una biblioteca de presentación en fago aleatorizada que se generó partiendo de un armazón de dominio V<sub>H</sub> a partir de un hibridoma de ratón.

El documento WO 00/29004 describe anticuerpos de dominio único murinos ("microcuerpos") contra TNF-alfa.

50 El documento WO 04/003019 entre otros describe ligandos que comprenden un primer dominio de unión contra TNF-alfa y un segundo dominio de unión contra una proteína sérica tal como albúmina sérica.

Un objetivo general de la presente invención es proporcionar nanocuerpos contra TNF-alfa, en particular contra TNF-alfa humano.

55 En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar nanocuerpos contra TNF-alfa, en particular contra TNF-alfa humano, y proporcionar proteínas o polipéptidos que comprenden los mismos, que sean adecuados para uso terapéutico y/o de diagnóstico, y en particular para la prevención, tratamiento y/o diagnóstico de una a más enfermedades y trastornos asociados con y/o mediados por TNF-alfa tales como los mencionados anteriormente, y/o que se puedan usar en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades asociadas con y/o mediadas por TNF-alfa, tales como las mencionadas anteriormente.

60 Más en particular, un objetivo de la invención es proporcionar nanocuerpos contra TNF-alfa, y proporcionar proteínas y polipéptidos que comprenden los mismos, que sean una alternativa a los nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descritos en el documento WO 04/041862 y/o que tengan una o más propiedades o características mejoradas, en comparación con los nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descritos en el documento WO 04/041862.

65

Más en particular, un objetivo de la invención es proporcionar nanocuerpos contra TNF-alfa, y proporcionar proteínas o polipéptidos que comprenden los mismos, que estén mejorados en comparación con los nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa descritos en el documento WO 04/041862 con respecto a uno o más de las siguientes propiedades o características:

- afinidad aumentada por TNF-alfa, en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o más adelante en el presente documento);

- mejor adecuación para dar formato en un formato multivalente (por ejemplo, en una forma bivalente);

- mejor adecuación para dar formato en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o más adelante en el presente documento);

- adecuación o propensión mejoradas para sustituciones "humanizantes" (tal como se define en el presente documento); y/o

- menor inmunogenicidad, en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o más adelante en el presente documento) en un formato monovalente;

- estabilidad aumentada, en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o más adelante en el presente documento) en un formato monovalente;

- especificidad aumentada frente a TNF-alfa, en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o más adelante en el presente documento) en un formato monovalente;

- reactividad cruzada reducida, o cuando se desee aumentada, con TNF-alfa de diferentes especies;

y/o

- una o más de otras propiedades mejoradas deseables para el uso farmacéutico (incluyendo uso profiláctico y/o uso terapéutico) y/o para uso de diagnóstico (incluyendo el, pero sin limitarse al, uso con propósitos de obtención de imágenes), en un formato monovalente, en un formato multivalente (por ejemplo, en un formato bivalente) y/o en un formato multiespecífico (por ejemplo, uno de los formatos multiespecíficos descritos en el documento WO 04/041862 o más adelante en el presente documento).

Estos objetivos se logran por los nanocuerpos, proteínas y polipéptidos tal como se definen por las reivindicaciones. Estos nanocuerpos también se denominan en el presente documento "nanocuerpos de la invención"; y estas proteínas y polipéptidos también se denominan colectivamente en el presente documento "polipéptidos de la invención".

Debido a que los nanocuerpos y polipéptidos descritos en el presente documento están destinados principalmente al uso terapéutico y/o de diagnóstico, se dirigen contra (tal como se define en el presente documento) TNF-alfa humano. Sin embargo, no se excluye (pero tampoco se requiere) que los nanocuerpos y polipéptidos descritos en el presente documento muestren reactividad cruzada con TNF-alfa de una o más de otras especies de animales de sangre caliente, por ejemplo con TNF-alfa de una o más de otras especies de primates y/o con TNF-alfa de una o más especies de animales que se usan con frecuencia 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 TNF-alfa (tales como los modelos de especies y animales mencionados en el presente documento). En este aspecto, será evidente para el experto que tal reactividad cruzada, cuando está presente, puede tener ventajas desde un punto de vista de desarrollo de fármacos, ya que permite someter a prueba los nanocuerpos y polipéptidos contra TNF-alfa humano en tales modelos de enfermedad.

Sin embargo, en una realización preferida, los nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento se dirigen contra y/o se pueden unir a un epítipo de TNF-alfa que se halla en y/o forma parte del/de los sitio(s) de unión al receptor de TNF (por ejemplo, los sitios de unión para el TNF-RI, TNF-RII, también conocidos como p55 o p75). Tal como se conoce bien en la técnica, un trímero de TNF comprende tres sitios de unión al receptor, que son esencialmente equivalentes y que se forman por/en la superficie de contacto de dos monómeros de TNF dentro del trímero de TNF. Por ejemplo, los nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento preferentemente se dirigen contra y/o se unen a un epítipo de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácidos de TNF-alfa; Gln en la posición 88, Lys en la posición 90 y/o Glu en la posición 146.

En particular, los nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento se dirigen contra y/o se pueden unir a un epítipo del trímero de TNF-alfa, que se halla en y/o forma parte del/de los sitio(s) de unión al receptor de TNF. Por ejemplo, los nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento se pueden dirigir contra y/o se pueden unir a un epítipo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácido:

- 5 Gln en la posición 88 y Lys en la posición 90 en un primer monómero de TNF (denominado en el presente documento "monómero A"), y Glu en la posición 146 en un segundo monómero de TNF (denominado en el presente documento "monómero B") (en el que el monómero A y el monómero B juntos, en el trímero de TNF, forman el/los sitio(s) de unión al receptor de TNF).
- 10 Más particularmente, los nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento se pueden dirigir contra y/o se pueden unir a un epítipo del trímero de TNF-alfa que comprende los aminoácidos mencionados anteriormente (Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B), y además al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácido del monómero A de TNF-alfa:
- 15 Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ile en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 115, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

Alternativamente, los nanocuerpos, proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento se pueden dirigir contra y/o se pueden unir a un epítipo de TNF-alfa que comprende los aminoácidos mencionados anteriormente (Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B), y además al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más y preferentemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácido del monómero A de TNF-alfa: Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, Ile en la posición 97, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137 y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición 33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

Tal epítipo se puede delinear a partir del análisis estructural del nanocuerpo cristalizado en el complejo con la molécula de TNF, o a partir de otros enfoques tales como mapeo de epítopos por medio de análisis de Pepscan.

35 En comparación, a partir de datos cristalográficos (no mostrados), se puede observar que el nanocuerpo 3E del documento WO 04/041862 se une a un epítipo diferente (es decir, un epítipo que comprende Tyr en la posición 141, Asp en la posición 140, Gln en la posición 67, Gly en la posición 24 y Glu en la posición 23) que el epítipo preferido.

40 Por tanto, en otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un dominio variable de inmunoglobulina (o un fragmento adecuado del mismo) que se puede unir a un epítipo de TNF-alfa que se halla en y/o forma parte de los sitios de unión al receptor de TNF, y preferentemente a un epítipo que comprende al menos uno, preferentemente dos o más, y preferentemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido de TNF-alfa: Gln en la posición 88; Lys en la posición 90 y Glu en la posición 146. Un dominio variable de inmunoglobulina de este tipo es preferentemente un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera, y en particular un dominio variable de cadena pesada, que puede ser cualquier dominio variable de cadena pesada de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, dominios variables de cadena pesada humanos, dominios variables de cadena pesada de ratón y dominios variables de cadena pesada de *Camelidae* (tales como los dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulinas de 4 cadenas de *Camelidae* o los dominios variables de cadena pesada (dominios V<sub>HH</sub>) a partir de denominados anticuerpos de cadena pesada). El dominio variable de inmunoglobulina es preferentemente un anticuerpo de dominio o anticuerpo de dominio único o adecuado para su uso como anticuerpo de dominio (simple). Lo más preferentemente, el dominio variable de inmunoglobulina es un nanocuerpo (tal como se define).

55 El dominio variable de inmunoglobulina mencionado anteriormente también puede humanizarse (tal como por ejemplo, y sin limitación) se describe en el presente documento con respecto a nanocuerpos. La invención también se refiere a proteínas y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en tales dominios variables de inmunoglobulina, que pueden ser, por ejemplo, tal como se define en el presente documento. Alternativamente, tales dominios variables pueden formar parte de constructos de ScFv, constructos de especificidad doble, anticuerpo quimérico o estructuras de anticuerpos y otros constructos de inmunoglobulina, tal como se revisa, por ejemplo, por Hoogenboom (Nature Biotechnology (1997), 15:125-126). Sin embargo, preferentemente, los dominios variables de inmunoglobulina dirigidos contra el epítipo anterior son nanocuerpos, en cuyo caso las proteínas y polipéptidos que comprenden tales nanocuerpos pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Se divulgan:

65 I) Un nanocuerpo que se dirige contra el mismo epítipo en el trímero de TNF-alfa que el nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52).

- II) Un nanocuerpo que se dirige contra el mismo epítipo en el trímero de TNF-alfa que el nanocuerpo TNF3 (SEQ ID NO: 60).
- 5 III) Un nanocuerpo que se dirige contra un epítipo del trímero de TNF-alfa que comprende al menos los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B.
- 10 IV) Un nanocuerpo que se dirige contra un epítipo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que comprende además al menos comprende al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácido del monómero A de TNF-alfa: Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ile en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 115, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.
- 15
- 20 V) Un nanocuerpo que se dirige contra un epítipo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que comprende además al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácido del monómero A de TNF-alfa: Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, Ile en la posición 97, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137 y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición 33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.
- 25
- 30 - Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$ .
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo V<sub>HH</sub> 3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 35
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 12 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 40
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 45
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 50
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que es un nanocuerpo humanizado.
- y algunos aspectos preferidos de esta realización se refieren a:
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que es un nanocuerpo de clase GLEW.
- 55
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que es nanocuerpo de clase GLEW humanizado.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- 60
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103, y que está humanizado.
- 65
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que es un nanocuerpo de clase GLEW y que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103, y que está humanizado.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.
- 5 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (TNF30).
- 10 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que
  - a) CDR1 comprende:
    - la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
    - 15 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
    - 20 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
  - y
  - b) CDR2 comprende:
    - 25 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
    - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
    - 30 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;
  - y
  - c) CDR3 comprende:
    - 35 - la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
    - 40 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
    - 45 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 50 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
- 55 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR3, comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que:
  - 60 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
  - 65 - CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 5 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que
- 10 a) CDR1 es:
- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
  - 15 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
  - 20 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- y en el que:
- b) CDR2 es:
- 25 - la secuencia de aminoácidos de EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la
  - 30 secuencia de aminoácidos de EINTNGLITKYPDSVKG; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;
- 35 y en el que
- c) CDR3 es:
- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
  - 40 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
  - 45 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- 50 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 55 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que:
- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
  - 60 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
  - CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos
  - 65 SPSGFN.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 5 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que
- 10 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).
- 15 y algunos otros aspectos preferidos de esta realización se refieren a:
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que es nanocuerpo de clase KERE.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que es nanocuerpo de clase KERE humanizado.
- 20 - Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) o 98 (TNF33).
- 25 - Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que
- a) CDR1 es:
- 30 - la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la
- 35 secuencia de aminoácidos NYVMG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NYVMG;
- 40 y
- b) CDR2 es:
- 45 - la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la
- 50 secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYKDSVKG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYKDSVKG;
- y
- 55 c) CDR3 es:
- la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
- 60 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la
- secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos
- 65 SILPLSDDPGWNTY.
- Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos



NYYMG.

- Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG.

5 - Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.

- Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que:

10 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYYMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY;  
o

15 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYYMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.

20 - Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYYMG; CDR2 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácidos ILPLSDDPGWNTY.

- Un nanocuerpo según cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, en el que

25 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o

- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

30 y siendo aún otros aspectos particularmente preferidos:

VI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores.

35 VII) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores.

40 VIII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores.

45 IX) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

X) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

50 XI) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, unido por medio de un ligador adecuado.

55 XII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, unido por medio de un ligador adecuado, y que está pegilado.

XIII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

60 XIV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

65 XV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores,

y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

5 XVI) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y que comprende además un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que cada uno de los dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, al nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

10 XVII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y que comprende además un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que cada uno de los dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, al nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

15 XVIII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y que comprende además un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que cada uno de los dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, al nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

20 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos VI) a XVIII) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.

25 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos VI) a XVIII) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

30 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos VI) a XVIII) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALE 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).

35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos VI) a XVIII) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos VI) a XVIII) anteriores, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos humanizados según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores, y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

45 Debe observarse que cuando un nanocuerpo se menciona anteriormente que es “según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores”, es al menos según uno de los puntos I) a V), puede ser según dos o más de los puntos I) a V), y también pueden incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son “según uno cualquiera de los puntos I) a V) anteriores”. De modo similar, cuando una proteína o polipéptido se menciona anteriormente que es “según uno cualquiera de los puntos VI) a XVIII) anteriores”, es al menos según uno de los puntos VI) a XVIII), puede ser según dos o más de los puntos VI) a XVIII), y también puede incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son “según uno cualquiera de los puntos VI) a XVIII) anteriores”.

50 También está dentro del alcance de la invención que, cuando sea aplicable, un nanocuerpo o polipéptido de la invención se puede unir a dos o más determinantes antigénicos, epítomos, partes, dominios, subunidades o conformaciones de TNF-alfa. En tal caso, los determinantes antigénicos, epítomos, partes, dominios o subunidades de TNF-alfa a los que se unen los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención pueden ser esencialmente iguales (por ejemplo, si TNF-alfa contiene motivos estructurales repetidos o está presente como un multímero) o pueden ser diferentes (y en este último caso, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a tales determinantes antigénicos, epítomos, partes, dominios, subunidades de TNF-alfa diferentes con una afinidad y/o especificidad que pueden ser iguales o diferentes). Asimismo, por ejemplo, cuando TNF-alfa existe en una conformación activada y en una conformación inactiva, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a una cualquiera de estas conformaciones o se pueden unir a ambas de estas conformaciones (es decir, con una afinidad y/o especificidad que pueden ser iguales o diferentes). Asimismo, por ejemplo, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a una conformación de TNF-alfa en el que está unida a un ligando pertinente, se pueden unir a una conformación de TNF-alfa en el que no está unida a un ligando pertinente, o se pueden unir a ambas de tales conformaciones (de nuevo con una afinidad y/o especificidad que pueden ser iguales o diferentes).

65 También se espera que los nanocuerpos y polipéptidos de la invención generalmente se unirán a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos que se producen de manera natural o sintéticos de TNF-alfa, o al

menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de TNF-alfa que contienen uno o más determinantes antigénicos o epítomos que son esencialmente los mismos que el/los determinante(s) antigénico(s) o epítomo(s) al/a los que se unen los nanocuerpos y polipéptidos de la invención en TNF-alfa (por ejemplo, en TNF-alfa de tipo natural). De nuevo, en tal caso, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a tales análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que son las mismas o diferentes de (es decir, mayores que o menores que) la afinidad y especificidad con la que se unen los nanocuerpos de la invención a TNF-alfa (de tipo natural). También se incluyen dentro del alcance de la invención que los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se unan a algunos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de TNF-alfa; pero no a otros.

En general, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se unirán al menos a estas formas (incluyendo formas monoméricas, multiméricas y asociadas) que son las más relevantes desde un punto de vista biológico y/o terapéutico, tal como resultará evidente para el experto.

Asimismo, debido a que TNF-alfa existe en una forma monomérica y en formas multiméricas, y en particular en forma trimérica, está dentro del alcance de la invención que los nanocuerpos y polipéptidos de la invención solo se unan a TNF-alfa en forma monomérica, o que los nanocuerpos y polipéptidos de la invención además también se unan a una o más de tales formas multiméricas, tales como la forma trimérica de TNF, o se pueden unir solo a tal forma multimérica (por ejemplo, trimérica). En consecuencia, generalmente cuando en esta descripción se hace referencia a un nanocuerpo, proteína o polipéptido que se dirige a TNF-alfa, se debe entender que esto también comprende los nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa en su forma trimérica (incluyendo, pero sin limitarse a, los nanocuerpos contra los sitios de unión al receptor (por ejemplo, los sitios de unión para el TNF-RI, TNF-RII, también conocidos como p55 o p75) de tal trímero). En todos estos casos, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a tales multímeros o complejos de proteína asociados con una afinidad y/o especificidad que pueden ser iguales que o diferentes de (es decir, mayores que o menores que) la afinidad y/o especificidad con la que se unen los nanocuerpos y polipéptidos de la invención a TNF-alfa en su estado monomérico y no asociado.

Asimismo, generalmente, los polipéptidos de la invención que contienen dos o más nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa se pueden unir con mayor avidez que el nanocuerpo o nanocuerpos monoméricos correspondientes.

Por ejemplo, y sin limitación, una proteína o polipéptido multivalente (tal como se define en el presente documento) que contiene dos o más nanocuerpos que se dirigen contra epítomos diferentes de TNF-alfa, proteína o polipéptido multivalente (tal como se define en el presente documento) que contiene dos o más nanocuerpos que se dirigen contra diferentes epítomos de TNF-alfa se pueden unir a TNF-alfa con mayor avidez que los monómeros correspondientes.

De modo más importante, una proteína o polipéptido multivalente (tal como se define en el presente documento) que contiene dos o más nanocuerpos que se dirigen contra TNF-alfa se pueden unir (y habitualmente se unirán) con mayor avidez a un multímero de TNF-alfa que a un monómero de TNF-alfa, y habitualmente también se unirán con mayor avidez que los nanocuerpos monoméricos correspondientes. En tal proteína o polipéptido multivalente, los dos o más nanocuerpos se pueden dirigir, por ejemplo, contra los mismos epítomos, epítomos sustancialmente equivalentes, o epítomos diferentes. En una realización de tal proteína o polipéptido multivalente, los dos o más nanocuerpos pueden ser iguales (y en consecuencia se dirigen contra el mismo epítomo).

Esto último es de particular importancia, ya que se sabe que el modo primario de transducción de señal por parte de TNF implica la reticulación por receptores de TNF por un trímero de moléculas de TNF, que contiene tres sitios de unión al receptor (véanse por ejemplo Peppel *et al.*, J. Exp. Med., 174 (1991), 1483-1489; Engelmann *et al.*, J. Biol. Chem., 265 (1990), 14497; Smith y Baglioni, J. Biol. Chem., 264 (1989), 14646). Por ejemplo, tal como se describe por Peppel *et al.*, un dominio extracelular monovalente modificado por ingeniería del receptor de TNF, que solo fue capaz de bloquear un único sitio de unión al receptor en un trímero de TNF, fue incapaz de evitar la reticulación de los receptores de TNF mediante los dos sitios de unión al receptor restantes; mientras que una proteína modificada por ingeniería que comprende dos de tales dominios extracelulares, que por tanto es capaz de bloquear dos sitios de unión al receptor, proporcionó una eficacia notable en comparación con el dominio extracelular monovalente.

Se ha hallado que los nanocuerpos monovalentes son capaces de unirse a TNF alfa de tal manera que se reduce la actividad de TNF, en los modelos *in vitro*, en los modelos celulares y en los modelos *ex vivo* (véase la sección experimental a continuación). Aunque la invención no se limita a ningún mecanismo, explicación o hipótesis específico, se considera que debido a su pequeño tamaño y alta afinidad por TNF-alfa, dos o tres nanocuerpos monovalentes de la invención son capaces de ocupar simultáneamente dos o tres sitios de unión al receptor diferentes en el trímero de TNF, evitando en consecuencia que el trímero inicie la reticulación del receptor y de este modo inicie la transducción de señal (sin embargo, no se excluyen otros mecanismos de acción: por ejemplo, dependiendo del epítomo contra el cual se dirige, un nanocuerpo de la invención también puede inhibir la asociación del TNF en el estado trimérico).

También se debe indicar que, de forma adicional o alternativa a la unión a dos o más sitios de unión al receptor en un único trímero de TNF, las proteínas o polipéptidos de la presente invención que comprenden o consisten esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que se dirigen contra epítomos de TNF-alfa se pueden unir (por ejemplo, de forma intermolecular) a epítomos en dos moléculas

de TNF-alfa independientes (por ejemplo, dos trímeros independientes).

Sin embargo, según una realización particularmente preferida, la divulgación se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que se dirigen cada uno contra epítomos en TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa) que se hallan y/o forman parte del/de los sitio(s) de unión al receptor del trímero de TNF, de modo que dicho polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

En particular, según esta realización preferida, la divulgación se refiere a una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que se dirigen cada uno contra epítomos en TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa) que se hallan en y/o forman parte del/de los sitio(s) de unión al receptor del trímero de TNF-alfa, en los que dichos dominios variables de inmunoglobulina están unidos entre sí de tal modo que la proteína o polipéptido es capaz de unirse simultáneamente a dos o más sitios de unión al receptor en un único trímero de TNF (en otras palabras, es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF). En esta realización, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina son preferentemente tal como se definió anteriormente y son lo más preferentemente nanocuerpos (de modo que la proteína o polipéptido es un constructo de nanocuerpo multivalente, tal como se describe adicionalmente en el presente documento). Asimismo, en esta realización, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina pueden ser iguales o diferentes; y se pueden dirigir contra epítomos diferentes dentro del/de los sitio(s) de unión al receptor de TNF, pero preferentemente se dirigen contra el mismo epítopo.

En un aspecto preferido de esta realización, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina se dirigen contra epítomos del trímero de TNF-alfa, epítomos que se hallan en y/o forman parte del/de los sitio(s) de unión al receptor de TNF. Por ejemplo, los dos o más dominios variables de inmunoglobulina preferentemente se dirigen contra y/o se pueden unir a un epítopo del trímero de TNF-alfa que comprende los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 y Lys en la posición 90 en un primer monómero de TNF (denominado en el presente documento "monómero A"), y Glu en la posición 146 en un segundo monómero de TNF (denominado en el presente documento "monómero B") (en el que el monómero A y el monómero B juntos, en el trímero de TNF, forman el/los sitio(s) de unión al receptor de TNF).

Tal como se describe adicionalmente más adelante con más detalle con respecto a los nanocuerpos, en tal proteína o polipéptido, los al menos dos dominios variables de inmunoglobulina están preferentemente unidos de tal manera que la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de los dos dominios variables de inmunoglobulina presentes en tal proteína o polipéptido es preferentemente de al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y más preferentemente en la región de Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom.

En un aspecto particularmente preferido de esta realización, estas dos o más secuencias de inmunoglobulina son nanocuerpos, y preferentemente se eligen de los nanocuerpos descritos en el presente documento. Algunos nanocuerpos particularmente preferidos para su uso en esta realización de la invención son PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO: 52) y/o PMP5F10 (TNF3, SEQ ID NO: 60), así como variantes humanizadas y otras del mismo (tal como se describe en el presente documento); prefiriéndose particularmente PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO: 52) y sus variantes humanizadas.

Por consiguiente, la presente realización se describirá a continuación con más detalle con referencia a nanocuerpos. Sin embargo, resultará evidente para el experto que las enseñanzas en el presente documento se pueden aplicar de manera análoga a dominios variables de inmunoglobulina.

En esta realización de la divulgación, las dos o más secuencias de inmunoglobulina se unirán habitualmente por medio de uno o más ligadores adecuados, ligadores que son de tal modo que cada secuencia de inmunoglobulina se puede unir a un sitio de unión al receptor diferente en el mismo trímero de TNF. Los ligadores adecuados dependerán entre otras cosas de (la distancia entre) los epítomos en el trímero de TNF al que se unen las secuencias de inmunoglobulina, y resultará evidente para el experto basándose en la divulgación en el presente documento, opcionalmente después de algún grado limitado de experimentación de rutina. Por ejemplo, cuando las dos o más secuencias de inmunoglobulina son anticuerpos de dominio (simple) o nanocuerpos, se pueden elegir ligadores adecuados de los ligadores descritos en el presente documento, pero con una longitud de ligador que es tal que los dos o más anticuerpos de dominio (simple) o nanocuerpos se pueden unir cada uno a sitios de unión al receptor diferentes en el mismo trímero de TNF.

Asimismo, cuando las dos o más secuencias de inmunoglobulina que se unen a los sitios de unión al receptor de TNF-alfa son anticuerpos de dominio (simple) o nanocuerpos, también se pueden unir entre sí por medio de un tercer anticuerpo de dominio (simple) o nanocuerpo (en el que las dos o más secuencias de inmunoglobulina se pueden unir directamente al tercer anticuerpo de dominio (simple)/nanocuerpo o por medio de ligadores adecuados). Tal tercer anticuerpo de dominio (simple) o nanocuerpo puede ser por ejemplo un anticuerpo de dominio (simple) o nanocuerpo

que proporciona un aumento de la semivida, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, este último anticuerpo de dominio (simple) o nanocuerpo puede ser un anticuerpo de dominio (simple) o nanocuerpo que es capaz de unirse a una proteína sérica (humana) tal como albúmina sérica (humana), como se describe adicionalmente en el presente documento.

Alternativamente, las dos o más secuencias de inmunoglobulina que se unen al/a los sitio(s) de unión al receptor de TNF-alfa se pueden unir en serie (o bien directamente o bien por medio de un ligador adecuado) y el tercer anticuerpo de dominio (simple) o nanocuerpo (que puede proporcionar aumento de la semivida, tal como se describió anteriormente) se puede conectar directamente o por medio de un ligador a una de estas dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas anteriormente. Algunos ejemplos no limitativos de tales constructos son los constructos de SEQ ID NO: 93 ó 94.

En particular, se ha hallado (véanse los datos cristalográficos mencionados en el presente documento) que, cuando los nanocuerpos presentes en una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífico de la invención se unen al epítipo particular que se describió anteriormente (que es el epítipo de TNF1 y sus variantes humanizadas, así como TNF3 y sus variantes humanizadas) entonces, preferentemente, los dos (o más) nanocuerpos anti-TNF presentes en tal proteína o polipéptido se deben unir de tal modo que la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos nanocuerpos anti-TNF presentes en tal proteína o polipéptido preferentemente deber ser de al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom (siendo el límite superior menos crítico, y eligiéndose por razones de conveniencia, por ejemplo con vistas a la expresión/producción de la proteína); o más generalmente que dicha distancia debe ser tal que permite que la proteína o polipéptido experimente unión intramolecular al trímero de TNF (es decir, en lugar de unión intermolecular). La distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos nanocuerpos anti-TNF se puede determinar por cualquier medio adecuado, tal como por cristalografía o modelado molecular (tal como se describe en el presente documento). Estas técnicas también hacen posible generalmente determinar si una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífico específico es capaz de proporcionar el modelado intramolecular. Alternativamente, la presente invención también proporciona un experimento simple que usa cromatografía de exclusión molecular (tal como se describe por Santora *et al.*, Anal. Biochem., 299: 119-129) que puede usarse para determinar si una proteína o polipéptido dado de la invención proporcionará (predominantemente) unión intramolecular a un trímero de TNF o (predominantemente) unión intermolecular entre dos o más trímeros de TNF-alfa. En consecuencia, en una realización particular de la divulgación, una proteína o polipéptido de la invención preferentemente es tal que en este experimento, conduce de forma predominante o esencialmente exclusiva a la unión intramolecular. Sin embargo, tal como se enfatizó anteriormente, debe observarse que las proteínas o polipéptidos de la invención que funcionan por medio de unión intermolecular de moléculas de TNF-alfa independientes (por ejemplo, trímeros) también están dentro del alcance de la presente invención.

En consecuencia, en otro aspecto preferido, la divulgación proporciona una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífico que comprende al menos dos nanocuerpos contra TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa), en el que dichos nanocuerpos preferentemente se dirigen esencialmente contra el mismo epítipo que el nanocuerpo PMP1C2 (tal como se menciona en el presente documento), y en el que dichos al menos dos nanocuerpos se unen de modo que la distancia la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de al menos dos nanocuerpos anti-TNF es tal que la proteína o polipéptido es capaz de experimentar unión intramolecular (tal como se describe en el presente documento) con un trímero de TNF-alfa. Preferentemente, en tal proteína o polipéptido, la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos nanocuerpos anti-TNF es de al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom.

En tal proteína o polipéptido preferido, los dos o más nanocuerpos se pueden unir de cualquier modo adecuado, siempre que se pueda obtener la distancia preferida entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de los al menos dos nanocuerpos anti-TNF, y/o siempre que la proteína o polipéptido sea capaz de experimentar la unión intramolecular (tal como se describe en el presente documento) con un trímero de TNF-alfa.

Por ejemplo, en su forma más simple, al menos dos nanocuerpos se unen directamente por medio de un ligador o espaciador adecuado que proporciona la distancia preferida entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de los al menos dos nanocuerpos anti-TNF y que pueden permitir que la proteína o polipéptido experimente la unión intramolecular (tal como se describe en el presente documento) con un trímero de TNF. En el presente documento se describen ligadores adecuados, y pueden comprender, por ejemplo y sin limitación, una secuencia de aminoácidos, secuencia de aminoácidos que preferentemente tiene una longitud de 14 aminoácidos, más preferentemente al menos 17 aminoácidos, tal como una secuencia de aproximadamente 20-40 aminoácidos (que, usando una distancia promedio de 3,5 Ångstrom para un aminoácido, corresponde a longitudes del ligador de 49 Ångstrom, 59,5 Ångstrom y aproximadamente 70 Ångstrom, respectivamente; calculándose la cantidad máxima de aminoácidos de la misma manera basándose en las distancias mencionadas anteriormente). Preferentemente, tal secuencia de aminoácidos también debe ser tal que permita que la proteína o polipéptido experimente la unión intramolecular (tal como se describe en el presente documento) con un trímero de TNF-alfa.

En consecuencia, en otro aspecto preferido, la divulgación proporciona una proteína o polipéptido multivalente o multiespecífico que comprende al menos dos nanocuerpos contra TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa),

en el que dichos nanocuerpos preferentemente se dirigen esencialmente contra el mismo epítipo que el nanocuerpo PMP1C2 (tal como se menciona en el presente documento), y en el que dichos al menos dos nanocuerpos están unidos directamente entre sí usando un ligador o espaciador adecuado de modo que la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de los al menos dos nanocuerpos anti-TNF es tal que la proteína o polipéptido es capaz de experimentar la unión intramolecular (tal como se describe en el presente documento) con un trímero de TNF. Preferentemente, en tal proteína o polipéptido, la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de dos nanocuerpos anti-TNF (y de este modo la longitud preferida del ligador o espaciador) es de al menos 50 Ångstrom, y más preferentemente en la región de 55-200 Ångstrom, y en particular en la región de 65-150 Ångstrom.

Más preferentemente, en este aspecto preferido, el ligador o espaciador es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 14, preferentemente al menos 17, más preferentemente al menos 20 aminoácidos (con un límite superior no crítico elegido por razones de conveniencia que es de aproximadamente 50, y preferentemente de aproximadamente 40 aminoácidos). En una realización preferida, pero no limitativa, el ligador consiste esencialmente en residuos de serina y glicina (como se describe adicionalmente a continuación). Por ejemplo, un ligador adecuado es el ligador GS30 que se describe en el presente documento, que comprende 30 residuos de aminoácido.

En otra realización, los al menos dos nanocuerpos contra TNF-alfa están unidos entre sí por medio de otro resto (opcionalmente por medio de uno o dos ligadores), tal como otra proteína o polipéptido. En esta realización, puede ser deseable tener la distancia preferida (es decir, tal como se mencionó anteriormente) entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de los al menos dos nanocuerpos anti-TNF, por ejemplo, de modo que la proteína o polipéptido todavía puede experimentar unión intramolecular (tal como se describe en el presente documento) con un trímero de TNF. En esta realización, los al menos dos nanocuerpos se pueden unir directamente al otro resto, o usando un ligador o espaciador adecuado, de nuevo siempre que aún se pueda lograr la distancia preferida y/o unión intramolecular deseada. El resto puede ser cualquier resto adecuado que no reduzca (demasiado) la unión de la proteína o polipéptido a TNF y/o las propiedades biológicas o farmacológicas deseadas adicionales de la proteína o polipéptido. Como tal, el resto puede ser esencialmente inactivo o puede ser biológicamente activo, y como tal puede o no mejorar las propiedades deseadas de la proteína o polipéptido y/o puede conferir una o más propiedades deseadas adicionales a la proteína o polipéptido. Por ejemplo, y sin limitación, el resto puede mejorar la semivida de la proteína o polipéptido, y/o puede reducir su inmunogenicidad o mejorar cualquier otra propiedad deseada. En una realización preferida, el resto puede ser otro nanocuerpo (incluyendo, pero sin limitarse a, un tercer nanocuerpo contra TNF-alfa, si bien esto no es necesario y habitualmente menos preferido), y en particular otro nanocuerpo que mejora la semivida de la proteína o polipéptido, tal como un nanocuerpo que se dirige contra una proteína sérica, por ejemplo contra albúmina sérica humana. En el presente documento se describen ejemplos de tales proteínas y polipéptidos.

En consecuencia, en una realización, la invención se refiere a un constructo multivalente multispecífico que comprende dos o más secuencias de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de las mismas) que se dirigen cada una contra epítopos en TNF-alfa (por ejemplo, del trímero de TNF-alfa) que se hallan en y/o forman parte del sitio de unión al receptor, y que están unidos entre sí por medio de al menos una secuencia de inmunoglobulina que proporciona aumento de la semivida (y opcionalmente por medio de uno o más ligadores adecuados), de modo que dicho polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por dicho trímero de TNF. Tal polipéptido puede ser tal que dichas dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas en primer lugar se pueden unir cada una a un sitio de unión al receptor diferente en un trímero de TNF.

En particular, en esta realización, el polipéptido puede comprender un nanocuerpo biespecífico trivalente, que comprende dos nanocuerpos que se dirigen cada uno contra epítopos en TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa) que se hallan en y/o forman parte del sitio de unión al receptor, en el que dichos nanocuerpos están unidos entre sí por medio de un tercer nanocuerpo que proporciona un aumento de la semivida (por ejemplo, un nanocuerpo que se dirige a una proteína sérica tal como albúmina sérica humana), en el que cada uno de los dos nanocuerpos mencionados en primer lugar se pueden unir directamente a dicho tercer nanocuerpo o por medio de uno o más ligadores adecuados, de modo que dicho polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por dicho trímero de TNF. Tal polipéptido puede ser tal que dichos dos nanocuerpos mencionados en primer lugar se pueden unir cada uno a sitios de unión al receptor diferentes en un trímero de TNF. De nuevo, algunos nanocuerpos particularmente preferidos para su uso en esta realización de la invención son PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO: 52) y/o PMP5F10 (TNF3, SEQ ID NO: 60), así como variantes humanizadas y otras (tal como se describe en el presente documento); prefiriéndose particularmente PMP1C2 (TNF1, SEQ ID NO: 52) y sus variantes humanizadas; y los nanocuerpos dirigidos contra albúmina sérica humana descritos en el presente documento. Algunos constructos preferidos, pero no limitativos, de esta realización de la invención son TNF 24 (SEQ ID NO: 90), TNF 26 (SEQ ID NO: 92), TNF 27 (SEQ ID NO: 93), TNF 28 (SEQ ID NO: 94), TNF 60 (SEQ ID NO: 417) y TNF 62 (SEQ ID NO: 418), de los cuales se prefiere particularmente TNF 60.

En consecuencia, algunos aspectos preferidos de esta realización de la divulgación se refieren a:

XIX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que se dirigen cada uno contra epítopos en TNF-alfa (y en

particular del trímero de TNF-alfa) que se hallan en y/o forman parte del/de los sitio(s) de unión al receptor del trímero de TNF, de modo que dicho polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

5 XX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos) que se dirigen cada uno contra epítomos en TNF-alfa (y en particular del trímero de TNF-alfa) que se hallan en y/o forman parte del/de los sitio(s) de unión al receptor del trímero de TNF, de modo que dicho polipéptido es capaz unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

10 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dichos dominios variables de inmunoglobulina están unidos entre sí de tal manera que la proteína o polipéptido es capaz de unirse de forma simultánea a dos o más sitios de unión al receptor en un único trímero de TNF.

15 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de unirse al mismo epítipo que el nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52).

20 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de unirse contra el epítipo dentro del sitio de unión al receptor de TNF del trímero de TNF que comprende al menos los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B.

25 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de unirse contra el epítipo dentro del sitio de unión al receptor de TNF del trímero de TNF que comprende al menos los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que comprende además al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más, y preferentemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácido del monómero A de TNF-alfa: Gly en la posición 24, Gln en la posición 25, Thr en la posición 72, His en la posición 73, Val en la posición 74, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 83, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ile en la posición 97, Arg en la posición 131, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137, Arg en la posición 138, Pro en la posición 139, Asp en la posición 140 y los siguientes residuos en el monómero B: Pro en la posición 20, Arg en la posición 32, Lys en la posición 65, Lys en la posición 112, Tyr en la posición 115, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dichos dominios variables de inmunoglobulina son capaces de unirse contra el epítipo dentro del sitio de unión al receptor de TNF del trímero de TNF que comprende al menos los siguientes residuos de aminoácido: Gln en la posición 88 en el monómero A; Lys en la posición 90 en el monómero A y Glu en la posición 146 en el monómero B; y que comprende además al menos uno, preferentemente dos o más, más preferentemente 5 o más y preferentemente todos o esencialmente todos, de los siguientes residuos de aminoácido del monómero A de TNF-alfa, Leu en la posición 75, Thr en la posición 77, Thr en la posición 79, Ile en la posición 80, Ser en la posición 81, Tyr en la posición 87, Thr en la posición 89, Val en la posición 91, Asn en la posición 92, Ser en la posición 95, Ile en la posición 97, Glu en la posición 135, Ile en la posición 136, Asn en la posición 137 y los siguientes residuos en el monómero B: Ala en la posición 33, Ala en la posición 145, Ser en la posición 147.

40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que al menos dos dominios variables de inmunoglobulina se unen de modo que la distancia entre el extremo N-terminal del primer dominio variable de inmunoglobulina y el extremo C-terminal del segundo dominio variable de inmunoglobulina presentes en tal proteína o polipéptido es de al menos 50 Ångstrom.

45 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que la distancia entre el extremo N-terminal primer dominio variable de inmunoglobulina y el extremo C-terminal del segundo dominio variable de inmunoglobulina está entre 55-200 Ångstrom.

50 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que la distancia entre el extremo N-terminal del primer dominio variable de inmunoglobulina y el extremo C-terminal del segundo dominio variable de inmunoglobulina está entre 65-150 Ångstrom.

55 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo están unidos entre sí por medio de un ligador o espaciador.

60 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el ligador o espaciador es una secuencia de aminoácidos.

65

## ES 2 778 123 T3

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el ligador o espaciador comprende al menos 14 residuos de aminoácido.
- 5 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el ligador o espaciador comprende al menos 17-50 residuos de aminoácido.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el ligador o espaciador consiste esencialmente en residuos de serina y glicina.
- 10 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el ligador o espaciador es GS30 (SEQ ID NO: 69).
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo están unidos entre sí por medio de otro resto.
- 15 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dicho otro resto es resto de proteína o polipéptido.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dicho otro resto confiere al menos una propiedad deseada a la proteína o polipéptido, o mejora al menos una propiedad deseada de la proteína o polipéptido.
- 20 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dicho otro resto mejora la semivida de la proteína o polipéptido y/o reduce la inmunogenicidad de la proteína o polipéptido.
- 25 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que cada uno de los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo se une a dicho otro resto por medio de un ligador o espaciador.
- 30 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el ligador o espaciador es una secuencia de aminoácidos.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el ligador o espaciador consiste esencialmente en residuos de serina y glicina.
- 35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que dicho otro resto es un nanocuerpo.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el otro resto es un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
- 40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.
- 45 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).
- 50 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.
- 55 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos.
- 60 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s); o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 65 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del



nanocuerpo V<sub>HH</sub> E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.

5 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KY descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 12 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.

10 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.

15 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; una variante humanizada de tal nanocuerpo.

20 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, que están humanizados;

siendo algunos aspectos particularmente preferidos de esta realización:

25 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos de clase GLEW.

30 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con un residuo de arginina (R) en la posición 103.

35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos de clase GLEW con un residuo de arginina (R) en la posición 103.

40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (TNF30).

45 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos como se describen para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en el que:

a) CDR1 comprende:

- secuencia de aminoácidos DYWMY; o

50 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;

55 y

b) CDR2 comprende:

60 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

65 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos

EINTNGLITKYPDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- 5
- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 15
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores, en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY.
  - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
  - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
  - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que:
- 30
- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
  - CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- 40
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
  - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
  - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que
- 55
- a) CDR1 es:
- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- 65

y en los que:

b) CDR2 es:

- 5 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;

y en los que

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 20 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 25 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- 30 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
- 35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que:
- 40 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 45 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 50 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 55 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 60 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que:
- 65 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o

- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).
- 5 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo se eligen del grupo que consiste en el nanocuerpo TNF1 (SEQ ID NO: 52) y variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 1 (SEQ ID NO: 52).
- 10 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo se eligen del grupo que consiste en TNF 13 (SEQ ID NO: 76), TNF 14 (SEQ ID NO: 77), TNF 29 (SEQ ID NO: 95) y TNF 30 (SEQ ID NO: 96).
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son TNF 30 (SEQ ID NO: 96);
- 15 y siendo algunos aspectos particularmente preferidos de esta realización:
  - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos de clase KERE.
  - 20 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos con al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) o 98 (TNF33).
  - 25 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que:
  - 30 a) CDR1 comprende:
    - la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
    - 35 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
    - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NYVMG;
    - 40 y
  - b) CDR2 comprende:
    - 45 - la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
    - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
    - 50 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG;
    - y
  - 55 c) CDR3 comprende:
    - la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
    - 60 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
    - 65 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG.
- 5 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG.
- 10 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) en los que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- 15 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que:
  - 20 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - 25 - CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ILPLSDDPGWNTY.
- 30 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que
  - 35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que
    - a) CDR1 es:
      - 40 - la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
      - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
      - 45 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NYVMG;
    - 50 y
    - b) CDR2 es:
      - la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
      - 55 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
      - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG;
      - 60 y
      - c) CDR3 es:
        - 65 - la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o

- 5 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
- 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- 15 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG.
- 20 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG.
- 25 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- 30 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que:
- 35 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
- 40 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
- 45 - CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- 50 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; CDR2 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácidos ILPLSDDPGWNTY.
- 55 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo son nanocuerpos tal como se describe para las proteínas o polipéptidos según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en los que
- 60 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
- 65 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo se eligen del grupo que consiste en el nanocuerpo TNF 3 (SEQ ID NO: 60) y variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 3 (SEQ ID NO: 60).
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX), en el que los dominios variables de inmunoglobulina primero y segundo se eligen del grupo que consiste en TNF20 (SEQ ID NO: 83), TNF21 (SEQ ID NO: 84), TNF 22 (SEQ ID NO: 85), TNF23 (SEQ ID NO: 86) o TNF33 (SEQ ID NO: 99).
- Debe observarse que cuando una proteína o polipéptido se menciona anteriormente que es “según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores”, es al menos según uno de los puntos XIX) a XX), y puede ser según los puntos tanto XIX) como XX), y también puede incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son “según uno cualquiera de los puntos XIX) a XX) anteriores”.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un nanocuerpo (tal como se define en el presente documento), contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:
- (i) CDR1 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 de SEQ ID NO: 15 a 21 o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 de SEQ ID NO: 164 a 197;

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente 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 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15 a 21 o con al menos una de las secuencias de CDR1 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 164 a 197, en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR1 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15 a 21 o con al menos una de las secuencias de CDR1 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 164 a 197, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en el que:

(ii) CDR2 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR2 de SEQ ID NO: 22 a 28 o del grupo que consiste en las secuencias de CDR2 de SEQ ID NO: 232 a 265;

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR2 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22 a 28 o con al menos una de las secuencias de CDR2 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 232 a 265, en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR2 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22 a 28 o con al menos una de las secuencias de CDR2 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 232 a 265, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en el que:

(iii) CDR3 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 de SEQ ID NO: 29 a 33 o del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 de SEQ ID NO: 300-333;

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR3 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29 a 33 o con al menos una de las secuencias de CDR3 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 300-333, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

5 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) o con al menos una de las secuencias de CDR3 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 300-333, en el que:

10 (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

15 o del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 de SEQ ID NO: 34 y 35

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR3 de SEQ ID NO: 34 y 35, en el que:

20 (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

25 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

30 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR3 de SEQ ID NO: 34 y 35, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

35 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

40 Algunas combinaciones particularmente preferidas, pero no limitativas, de secuencias de CDR pueden observarse en la tabla I a continuación, que indica las CDR y secuencias de entramado que están presentes en varios nanocuerpos preferidos (pero no limitativos) de la invención. Como resultará evidente para el experto, habitualmente se preferirá 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 I) (aunque la invención en su sentido más amplio no se limita a lo mismo, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias de CDR mencionadas en la tabla I).

45 Asimismo, en los nanocuerpos que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas en la tabla I, cada CDR puede sustituirse por una CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con las CDR mencionadas; en las que

50 (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

55 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o elegirse del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 (tal como se indica en el párrafo anterior) "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con la(s) CDR mencionada(s) de una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

60 (1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

65 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).



Sin embargo, como resultará evidente para el experto, generalmente se preferirán las (combinaciones de) secuencias de CDR mencionadas en la tabla I.

Tabla I: Combinaciones preferidas de secuencias de entramado y CDR

Cdon	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	D		D		D		D		D		D		D	
PMP1C2 (TNF1)	3	QVQLVESGGGLVQPG	1		9	WVROAPGKG	3	EINTNGLITKYP	6	RFTISRDNAKNTLYLQMNLSL	0		3	RGQGT
	0	GSLRLSCAASGFTFS	4	DYWMY	8	LEWVS	2	DSVKG	6	KPEDTALYYCAR	0	SPSGFN	4	QVTVSS
PMP1G11	3	QVQLQESGGGMVQPG	1		9	WVROAPGKG	3	EINTNGLITKYP	6	RFTISRDNAKNTLYLQMNLSL	0		3	RGQGT
	1	GSLRLSCAASGDFG	5	VSWMY	9	LEWVS	3	DSVKG	7	KPEDTALYYCAR	1	SPSGSF	5	QVTVSS
PMP1H6	3	EVQLVESGGGLVQPG	1		0	WVROAPGKG	3	EINTNGLITKYP	6	RFTISRDNAKNTLYLQMNLSL	0		3	RGQGT
	2	GSLRLSCAASGDFDS	6	VSWMY	0	LEWVS	4	DSVKG	8	KPEDTALYYCAR	2	SPSGSF	6	QVTVSS
PMP1G5 (TNF2)	3	QVQLVESGGGLVQAG	6	EPGYT	0	WFRQAPGKE	3	RIYWSSGLTYY	6	RFTISRDIKAKNTVDLLMNSL	0	RDGIPTRSV	3	WGQGT
	3	GSLRLSCAASGRTFS	7	YTIG	1	REFVA	5	ADSVKG	9	KPEDTAVYYCAA	3	GSYNY	7	QVTVSS
PMP1H2	3	QVQLVESGGGLVQPG	6	DYSGYT	0	WFRQAPGKE	3	RIYWSSGNTYY	7	RFTISRDIKAKNTVDLLMNSL	0	RDGIPTRSV	3	WGQGT
	4	DSLRLSCAASGRTFS	8	YTVG	2	REFVA	6	ADSVKG	0	EPEPTAVYYCAA	4	ESYNY	8	QVTVSS
PMP3G2	3	AVQLVESGGGLVQPG	6	DYSGYT	0	WFRQAPGKE	3	RIYWSSGNTYY	7	RFTISRDIKAKNTVDLLMNSL	0	RDGIPTRSV	3	WGQGT
	5	DSLRLSCAASGRTFS	9	YTVG	3	REFVA	7	ADSVKG	1	EPEPTAVYYCAA	5	ESYNY	9	QVTVSS
PMP1D2	3	AVQLVDSGGGLVQAG	7	AHSVYT	0	WFRQAPGKE	3	RIYWSSANTYY	7	RFTISRDNAKNTVDLLMNSL	0	RDGIPTRSV	4	WGQGT
	6	GSLRLSCAASGRTFS	0	MG	4	REFVA	8	ADSVKG	2	KPEDTAVYYCAA	6	EAYNY	0	QVTVSS

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	1 D	1 D	1 D	1 D	1 D	1 D	1 D
PMP3D10	3 QVQLVESGGGLVQAGG 7 SLSLSCAASGRSFT	1 GYMG	2 WFRQAPG 5 KERQLLA	3 SISWRGDNITYYKE 9 SVKG	7 RFTISRDDAKNTIYLOMN 3 SLKPEDTAVYYCAA	0 SILPLSDDPG 7 WNTN	3 WGQG 4 TQVTV 1 SS
PMP5F10 (TNF3)	3 EVQLVESGGGLVQAGG 8 SLSLSCAASGRSLS	2 NYMG	2 WFRQAPG 6 KERELLG	4 NISWRGNYIYKDS 0 VKG	7 RFTISRDDAKNTIYLOMN 4 RLKPEDTAVYYCAA	0 SILPLSDDPG 8 WNTY	3 WGQG 4 TQVTV 2 SS
NC55TNF_ S1C4	3 EVQLVESGGGLVQAGD 9 SLRLSCAASQIIFG	3 SHVAA	2 WFRQAPG 7 REREFVA	4 EIRPSGDFGPEGE 1 FEHVTASLKG	7 RFTIAKNSVDNTIYLOMN 5 NSLKPEDTAVYYCAA	0 APYRGGGRDYR 9 WEYEY	3 WGQG 4 TQVTV 3 SS
NC55TNF_ S1C3	4 EVQLVESGGGLVQPPG 0 SLRLSCKNAGSTSN	4 AYATG	2 WFRRAPG 8 KEREVFA	4 GIQWSGGDAFYRN 2 SVKG	7 RFRITRDPONTIYLOMN 6 DLKPEDTAVYYCAQ	1 KLSPIYNDFD 0 SSNEY	3 WGQG 4 TQVTV 4 SS
NC55TNF_ S2C1	4 EVQLVESGGDLVQPPG 1 SLRLSCAVSGQLFS	5 TNDVG	2 WYRRAPG 9 KQRELVA	4 TITDDGTTDYGDD 3 VKG	7 RFVISREGEMVYLEMNS 7 LKPEDTAVYYCNI	1 NLRSTWGRIR 1 YDV	3 WGQG 4 TQVTV 5 SS
NC55TNF_ S2C5	4 EVQLVESGGGLVQPPG 2 SLRLSCVWSGFIFS	6 TTSMT	1 WVRQAPG 0 KFEWWS	4 FINS DGSSTIYADS 4 VKG	7 RFTISRDNKNTIYLOMN 8 SLKPEDTAVYYCGR	1 RGYGRD	3 RSRGI 4 QVTVA 6 S
NC55TNF_ S3C7	4 EVQLVESGGGTVQAGD 3 SLRLSCAASGRSFS	7 SVAMG	2 WFRQAPG 1 KQREFLA	4 GVGYDGSIRIYAE 5 SVKG	7 RFTIARGNRESTVFLQMN 9 ENLKPEDTAVYFCTA	1 EPIGAYEGLW 3 TY	3 WGQG 4 TQVTV 7 SS

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
NC55TNF_S3C1	1 TNF- 4 ALPHAVESGGGLMOPG 4 GSLKLSCAASGFMS	1 7 8 DSAMG	2 1 WFRQAPGK 2 EREFVA	2 4 TISWNGGSS 6 SYADFYKG	2 8 RFTISRDNKNTVYLMQNG 0 LTPQDTAIYYCAG	3 1 SYSNGNPHRFS 4 QYQY	3 WGQG 4 TQVTV 8 SS
NC55TNF_BMP1B2	1 4 EVQLVESGGGLVOAGG 5 SLRLSCAASGRFTG	1 7 9 TYAMG	2 1 WFRQAPGK 3 EREFVA	2 4 AISWGGGSIV 7 YAESAKG	2 8 RFTISRDNKXTMYLQMD5 1 LKPEDTAVYYCAA	3 1 5 ANNIATLRQGS	3 WGQG 4 TQVTV 9 SS
NC55TNF_BMP1D2	1 4 EVQLVESGGGLVQAGGS 6 LKLSCTASGRNFV	1 8 0 TYAMS	2 1 WFRAPGKE 4 REFVA	2 4 SISWSGDTT 8 YYSNSVKG	2 8 RFTVSRDNKNTAYLRMIN 2 SLKPEDTADYYCAV	3 1 6 NLDDYDY	3 LGSST 5 QVTVS 0 S
NC55TNF_BMP1E2	1 4 EVQLVESGGRLVQPPG 7 SLRLSCKNAGSTSN	1 8 1 AYATG	2 1 WFRAPGKE 5 REFVA	2 4 GIOWSGGDA 9 FYRNSVKG	2 8 RFRITRDPDNTVYLMINDL 3 KPEDTAIYYCAQ	3 1 7 SNYEY	3 WGQG 5 TQVTV 1 SS
NC55TNF_BMP1G2	1 4 EVQLVESGGGLVQPPG 8 SLRLSCAASATISS	1 8 2 IVMLG	2 1 WYRQAPGK 6 QREWWA	2 5 SITIGSRITNY 0 ADSVKG	2 8 RFTISRDNKNTVYLMQNS 4 LKPEDTAVYFCNA	3 1 8 VPPRODY	3 WGQG 5 TQVTV 2 SS
NC55TNF_BMP2A2	1 4 EVQLVESGGGLVOAGG 9 SLRLSCAASGGTSS	1 8 3 SYDMG	2 1 WFRQAPGE 7 GREFVA	2 5 RISGSDGSTY 1 YSDRAKD	2 8 RFTISRDNKNTMYLQIMD 5 RLKPDQDTAVYYCRV	3 1 9 DY	3 WGQG 5 TQVTV 3 SS
NC55TNF_BMP2C2	1 5 EVQLVESGGGLVQPPG 0 SLRLSCAASGS5TFS	1 8 4 TYDMS	2 1 WVRQAPGK 8 GLEWVS	2 5 GIDSGGGSP 2 MYVDSVKG	2 8 RFTVSRDNKNTLYLQMIN 6 SLKPEDTAVYYCAK	3 2 0 FSTGADGGSW YWSYGMDS	3 WGKGT 5 QVTVS 4 S

Clon	1	FR1	1	CDR1	1	FR2	1	CDR2	1	FR3	1	CDR3	1	FR4
	D		D		D		D		D		D		D	
NC55TNF _BMP2F2	1	EVQLVESGGGLVQAG	8	WFRQAPGK	2	RVDVSGGNT	5	RFTVSRINGKNAMYLQMNHL	8	GGWGTTQYDY	2	GGWG	3	WGQG
	5	DSLRLSCEASERSN	5	EREFLA	9	LYGDSVKD	3	KPEDITAIYYCAA	7	DY	1	DY	1	SS
NC55TNF _NC10	1	EVQLVESGGGLVQPG	8	WVROAPGK	2	FINS DGSSTT	5	RFKISRDNAKKTLYLQMNLSL	8	RGYALD	2	RGYALD	2	QVTVS
	2	GSLRLSCVCSGGCT	8	AEEWVS	0	YADSVNG	4	GPEDITAMYYCQR	8		2		2	S
NC55TNF _NC11	1	EVQLVESGGGLVQAG	8	WFRQPPGK	2	SIKWNQNT	5	RFTISRGNKNTENTVLSLQM	8	DSSHYSVYYSK	2	DSSHYSVYYSK	2	WGQG
	3	DSLTLSCASSGRGFY	7	EREFLA	1	YYADSVRG	5	NSLKPEDTADYYCAA	9	AYEYDY	3	AYEYDY	3	TQVTV
NC55TNF _NC1	1	EVQLVESGGGLVQPG	8	WVROAPGK	2	FINS DGSSTT	5	RFTISRDNKNTLYLQMNLSL	9	RGYGRD	4	RGYGRD	4	S
	4	GSLRLSCVFSGF AFS	8	YEEWVS	2	YADSVQG	6	KSEDTAMYYCGR	0		2		2	WGQG
NC55TNF _NC2	1	EVQLVESGGGLVQAG	8	WFRQAPGK	2	AISWSGTITN	5	RFTISRDNKNTVHLOMNLSL	9	VQPYSGGDYY	2	VQPYSGGDYY	2	TQVTV
	5	GSLRLSCAASGR TFS	9	EREFLA	3	YADSVKG	7	KPEDITAVYHC AV	1	TGVEEYDY	5	TGVEEYDY	5	SS
NC55TNF _NC3	1	EVQLVESGGGLVQPG	9	WVROAPGK	2	FINS DGSSTT	5	RFTISRDNKNTLYLQMNDDL	9	RGYGRD	6	RGYGRD	6	S
	6	GSLRLSCVVS GF TFS	0	AEEWVS	4	YADSVKG	8	QSEDTAMYYCGR	2		3		3	WGQG
NC55TNF _NC5	1	EVQLVESGGGLVQAG	9	WFRQAPGE	2	RISGSGDST	5	RFTISRDNKNTVYLQMNLSL	9	ARYNGTWSSN	2	ARYNGTWSSN	2	TQVTV
	7	GSLRLSCAASGG AFS	1	GREIVA	5	YSSNRAKG	9	KREDTAVYYCRA	3	DY	7	DY	7	SS

Clon	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	D		D		D		D		D		D		D	
NC55TN F_NC6	1 5 8	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCECVSSGCT	1 9 2	FSAYSM T	2 2 6	WVROAPGKA EEFVS	2 6 0	FINS DGSSTT YANSVNG	2 9 4	RFKISRDNKNTLYLOMNSL GPEDTAMYVCQR	3 2 8	RGYALD	3 6 2	RGOGTQ VTVSS
NC55TN F_NC7	1 5 9	QVQLVESGGGLVQAGGS LRLSCTASGTSS	1 9 3	TADMG	2 2 7	WFRQPPGKG REFVA	2 6 1	RISGIDGTTY YDEPVKG	2 9 5	RFTISRDNKAQNTVYLOMDSL KPEDTAVVYCRS	3 2 9	PRYADGW SAYDY	3 6 3	WGOGTQ VTVSS
NC55TN F_NC8	1 6 0	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCVWSGFTFS	1 9 4	TTSMT	2 2 8	WVROAPGKF EEWVS	2 6 2	FINS DGSSTT YADSVKG	2 9 6	RFTISRDNKNTLYLOMNSL KPEDTAMYVCGR	3 3 0	RGYGRD	3 6 4	RSKGIQV TVSS
NC55TN F_S2C2	1 6 1	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCVASASGVK	1 9 5	VNDMG	2 2 9	WYRQAPGKE RELVA	2 6 3	TITODGRTNY EDFAKG	2 9 7	RFTISRDNKNTVYLOMNSL LPEDTAVVYCA	3 3 1	RTYWAHL PTY	3 6 5	WGOGTQ VTVSS
NC55TN F_S1C6	1 6 2	EVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGRSFG	1 9 6	SVAMG	2 3 0	WFRQAPGKE REFVA	2 6 4	AIGYDGNRIR YGDSVKG	2 9 8	RFTISRDNKNTMYLEMENL NADOTARYLCAA	3 3 2	EPLARYE GLWTY	3 6 6	WGOGTQ VTVSS
NC55TN F_S3C2	1 6 3	EVQLVESGGGLVQAGASL RLSCTTSTRTN	1 9 7	DRFNMA	2 3 1	WFRQAPGKD REFVS	2 6 5	RIDVAGYNTA YGFYVKG	2 9 9	RFTVSRDSEAENTVWLOMNSL RPEDTGVVYCAA	3 3 9	CGWGISQ SDYDL	3 6 7	WGOGTQ VTVSS

Notas a la tabla I:

- ID se refiere a SEQ ID NO en la lista de secuencias adjunta
- Para CDR1: SEQ ID NO: 164 corresponde a SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 167 corresponde a SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 172 corresponde a SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 165 y 166 corresponden a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 170 corresponde a SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 171 corresponde a SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 168 y 169 corresponden a SEQ ID NO: 21.
- Para CDR2: SEQ ID NO: 232 y 233 corresponden a SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 235 corresponde a SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 240 corresponde a SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 234 corresponde a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 236 y 237 corresponden a SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 238 corresponde a SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 239 corresponde a SEQ ID NO: 28.
- Para CDR3: SEQ ID NO: 303 corresponde a SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 308 corresponde a SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 306 corresponde a SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 307 corresponde a SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 304 y 305 corresponden a SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 300 corresponde a SEQ ID NO: 34, y SEQ ID NO: 301 y 302 corresponden a SEQ ID NO: 35.

En consecuencia, en los nanocuerpos de la divulgación, al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I; o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente 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, indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I. En este contexto, por "elegido adecuadamente" 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 secuencias de CDR3 adecuadas (es decir, tal como se define en el presente documento), respectivamente.

En particular, en los nanocuerpos de la divulgación al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR3 que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla I.

Preferentemente, en los nanocuerpos de la divulgación 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, indicadas en la tabla I o del grupo que consiste en secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I.

En particular, en los nanocuerpos de la divulgación al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR3 que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla I, 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, indicadas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, indicadas en la tabla I.

Lo más preferentemente, en los nanocuerpos de la divulgación 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, indicadas en la tabla I o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I.

Incluso más preferentemente, en los nanocuerpos de la divulgación al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I. Preferentemente, en esta realización, al menos una o preferentemente ambas de las otras dos secuencias de CDR presentes se eligen adecuadamente de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR correspondientes, respectivamente, indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias correspondientes, respectivamente, indicadas en la tabla I.

En particular, en los nanocuerpos de la divulgación al menos la secuencia de CDR3 presente se elige adecuadamente del grupo que consiste en la CDR3 indicada en la tabla I. Preferentemente, en esta realización, al menos una y preferentemente 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%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en las secuencias

de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, indicadas en la tabla I.

Incluso más preferentemente, en los nanocuerpos de la divulgación 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, indicadas en la tabla I. Preferentemente, en esta realización, la secuencia de CDR restante presente se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR correspondientes indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con al menos una de las secuencias correspondientes indicadas en la tabla I.

En particular, en los nanocuerpos de la divulgación al menos la secuencia de CDR3 se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla I, y o bien la secuencia de CDR1 o bien la secuencia de CDR2 se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, indicadas en la tabla I. Preferentemente, en esta realización, la secuencia de CDR restante presente se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de CDR correspondientes indicadas en la tabla I; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con las secuencias de CDR correspondientes indicadas en la tabla I.

Incluso más preferentemente, en los nanocuerpos de la divulgación 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, indicadas en la tabla I.

Asimismo, generalmente, se prefieren las combinaciones de CDR indicadas en la tabla I (es decir, las mencionadas en la misma línea en la tabla I). Por tanto, generalmente se prefiere que, cuando una CDR en un nanocuerpo de la divulgación es una secuencia de CDR mencionada en la tabla I o se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de CDR indicada en la tabla I; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con una secuencia de CDR indicada en la tabla I, que al menos una y preferentemente ambas de las otras CDR se elijan adecuadamente de las secuencias de CDR que pertenecen a la misma combinación en la tabla I (es decir, mencionadas en la misma línea en la tabla I) o se elijan adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente 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 solo 1 diferencia(s) 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 I.

Por tanto, por medio de ejemplos no limitativos, un nanocuerpo de la divulgación puede comprender, por ejemplo, una secuencia de CDR1 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR1 mencionadas en la tabla I, una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencia(s) de aminoácido con una de las secuencias de CDR2 mencionadas en la tabla I (pero que pertenece a una combinación diferente), y una secuencia de CDR3.

Algunos nanocuerpos preferidos de la divulgación pueden comprender, por ejemplo: (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 I; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencia(s) de aminoácido con una de las secuencias de CDR2 mencionadas en la tabla I (pero que pertenece 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 I (pero que pertenece 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 I; una secuencia de CDR2, y una de las secuencias de CDR3 indicadas en la tabla I; o (3) una secuencia de CDR1; una secuencia de CDR2 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una de las secuencias de CDR2 indicadas en la tabla I; y una secuencia de CDR3 que tiene 3, 2 o 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación que la secuencia de CDR2.

Algunos nanocuerpos particularmente preferidos de la divulgación pueden comprender, por ejemplo: (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 I; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla I 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 I que pertenece a la misma combinación; (2) una secuencia de CDR1; una CDR2 indicada en la tabla I y una secuencia de CDR3 indicada en la tabla I (en los que la secuencia de CDR2 y la secuencia de CDR3 pueden pertenecer a combinaciones diferentes).



5 Algunos nanocuerpos incluso más preferidos de la divulgación pueden comprender, por ejemplo: (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 I; la secuencia de CDR2 indicada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; y una secuencia de CDR3 mencionada en la tabla I que pertenece a una combinación diferente; o (2) una secuencia de CDR1 mencionada en la tabla I; una secuencia de CDR2 que tiene 3, 2 o 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; y más del 80% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR3 indicada en la tabla I que pertenece a la misma combinación diferente.

10 Nanocuerpos particularmente preferidos de la divulgación pueden comprender, por ejemplo, una secuencia de CDR1 mencionada en la tabla I, una secuencia de CDR2 que tiene más del 80% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR2 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma combinación; y la secuencia de CDR3 mencionada en la tabla I que pertenece a la misma.

15 En lo más preferido en los nanocuerpos de la divulgación las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente de una de las combinaciones de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, indicadas en la tabla I.

20 Preferentemente, cuando una secuencia de CDR se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de CDR indicadas en la tabla I; y/o cuando una secuencia de CDR se elige adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia de aminoácido con una de las secuencias de CDR indicadas en la tabla I:

25 i) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

30 ii) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia de CDR indicada en la tabla I.

35 Según una realización no limitativa pero preferida de la divulgación, las secuencias de CDR en los nanocuerpos de la divulgación son tal como se definieron anteriormente y también son tales que el nanocuerpo de la divulgación se une a TNF-alfa con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos, y preferentemente de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos y más preferentemente de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M), y/o con una constante de asociación ( $K_A$ ) de al menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>, preferentemente al menos  $10^8$  M<sup>-1</sup>, más preferentemente al menos  $10^9$  M<sup>-1</sup>, tal como al menos  $10^{12}$  M<sup>-1</sup>, y en particular con una  $K_D$  de menos de 500 nM, preferentemente menos de 200 nM, más preferentemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 pM. Los valores de  $K_D$  y  $K_A$  del nanocuerpo de la divulgación contra TNF-alfa se pueden determinar de una manera conocida en sí misma, por ejemplo usando el ensayo descrito en el presente documento.

45 Según otra realización preferida, pero no limitativa, de la divulgación (a) CDR1 tiene una longitud de entre 1 y 12 residuos de aminoácido, y habitualmente entre 2 y 9 residuos de aminoácido, tal 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, tal 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, tal como entre 6 y 23 residuos de aminoácido.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona nanocuerpos contra TNF-alfa que funcionan mejor que el nanocuerpo 3E, el nanocuerpo que mejor funciona según el documento WO 04/041862.

Más específicamente, algunos aspectos preferidos son:

55 XXI) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s); o una variante humanizada de tal nanocuerpo.

60 XXII) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo V<sub>HH</sub> 3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.

65 XXIII) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 12 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.

XXIV) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.

5 XXV) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo;

10 siendo algunos aspectos particularmente preferidos:

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que es un nanocuerpo de clase GLEW.

15 - Un nanocuerpo de con según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que es un nanocuerpo humanizado.

20 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.

25 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente el 95%, más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (TNF30).

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que

30 a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o

35 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;

40 y

b) CDR2 comprende:

45 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

50 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;

y

55 c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

60 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

65 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos DYWMY.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG

5 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que

10 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

15 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

- CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

20 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

25 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que:

a) CDR1 es:

30 - la secuencia de aminoácidos DYWMY; o

35 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos DYWMY; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;

40 y en el que:

b) CDR2 es:

45 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

50 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido) con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;

y en el que

55 c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

60 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún con más preferencia al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

65 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos

DYWMY.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.

5 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que:

10 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o

15 - CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

20 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

25 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que

- cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o

30 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

y siendo algunos otros aspectos particularmente preferidos:

35 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que es un nanocuerpo de clase KERE.

40 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) o 98 (TNF33).

- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que

45 a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácidos NYVMG; o

50 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NYVMG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NYVMG;

55 y

b) CDR2 comprende:

60 - la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o

65 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- 5
- la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la
  - 10 secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
  - 15 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG.
  - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR2 comprende la secuencia de
  - 20 aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG.
  - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
  - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que:
  - 25 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos
  - 30 NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
  - 35 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ILPLSDDPGWNTY.
  - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que
  - 40

a) CDR1 es:

- la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
- 45 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos
- 50 NYVMG;

y

b) CDR2 es:

- 55
- la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la
  - 60 secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG;

65 y

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
- 5 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
- 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG.
- 15 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- 20 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que:
  - CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
  - 25 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - 30 - CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; CDR2 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácidos ILPLSDDPGWNTY.
- 35 - Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), en el que
  - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
  - 40 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).
- Un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), que es un nanocuerpo humanizado.
- 45 y siendo aún algunos otros aspectos particularmente preferidos:
  - XXVI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un nanocuerpo según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV).
  - 50 XXVII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV).
  - XXVIII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.
  - 55 XXIX) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.
  - 60 XXX) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), unidos por medio de un ligador adecuado.
  - 65 XXXI) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), unidos por medio de un ligador adecuado, y que está pegilado.

XXXII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

5 XXXIII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

10 XXXIV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

15 XXXV) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que comprende además un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que cada uno de los dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV) está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, al nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

20 XXXVI) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que comprende además un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que cada uno de los dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV) está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, al nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

25 XXXVII) Una proteína o polipéptido que comprende dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana en el que cada uno de los dos nanocuerpos según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV) está unido, opcionalmente por medio de un ligador adecuado, al nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor en un trímero de TNF.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XXVI) a XXXVII) en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.

35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XXVI) a XXXVII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XXVI) a XXXVII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).

45 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XXVI) a XXXVII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XXVI) a XXXVII), que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos humanizados según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV), y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

50 Debe observarse que cuando un nanocuerpo se menciona anteriormente que es “según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV) anteriores”, es al menos según uno de los puntos XXI) a XXV), puede ser según dos o más de los puntos XXI) a XXV), y también pueden incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son “según uno cualquiera de los puntos XXI) a XXV) anteriores”. De modo similar, cuando una proteína o polipéptido se menciona anteriormente que es ser “según uno cualquiera de los puntos XXVI) a XXXVII) anteriores”, es al menos según uno de los puntos XXVI) a XXXVII), puede ser según dos o más de los puntos XXVI) a XXXVII), y también puede incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son “según uno cualquiera de los puntos XXVI) a XXXVII) anteriores”.

60 Un que se ha hallado que es particularmente útil como anticuerpo anti-TNF es el clon PMP1C2 (TNF1). Tal como se puede observar a partir de los datos comparativos del ensayo de KYM en la tabla 39, TNF1 tiene un valor de EC50 que es más de 4 veces mejor que el mejor nanocuerpo monovalente descrito en el documento WO 04/41862 (nanocuerpo 3E), es decir 2,466 nM para PMP1C2 frente a 12 nM para 3E (tal como se puede observar a partir de la tabla 39, todos los nanocuerpos TNF1 a TNF 9 de la invención dieron un valor de EC50 mejor en este ensayo que 3E). En este aspecto, también se debe indicar que el nanocuerpo 3E del documento WO 04/41862 pertenece a la “clase KERE” (tal como se describe en el presente documento), y en consecuencia se puede humanizar en un grado menor que el nanocuerpo PMP1C2 (que pertenece a la “clase GLEW”). Cuando el nanocuerpo PMP1C2 se compara

65

con el nanocuerpo 1A del documento WO 04/41862, un nanocuerpo de clase GLEW con el mayor grado de homología de secuencia con PMP1C2 (tanto en las CDR como en los entramados), el valor de EC50 obtenido para PMP1C2 en el ensayo de KYM es más de 50 veces mejor, es decir 2,466 nM para PMP1C2 en comparación con 100 nM para 1A.

5 Por consiguiente, se divulgan nanocuerpos que comprenden una o más, preferentemente dos cualesquiera y más preferentemente las tres CDR presentes en el clon PMP1C2 (o secuencias de CDR que derivan de las mismas o corresponden a las mismas). Asimismo, estos nanocuerpos preferentemente pertenecen el "grupo 103 P,R,S" (tal como se define en el presente documento), y lo más preferentemente tienen un R en la posición 103, y preferentemente también tienen una secuencia GLEW o tipo GLEW en las posiciones 44-47. Asimismo, cuando estos nanocuerpos pertenecen al "grupo 103 P,R,S" (y en particular cuando tienen un R en la posición 103), una sustitución humanizante preferida pero no limitativa es de 108Q a 108L. Otras sustituciones humanizantes preferidas pero no limitativas en estos nanocuerpos preferidos son una o más de las presentes en las variantes humanizadas de TNF1 descritas en el presente documento, tales como TNF13, TNF14, TNF29 o TNF30, como resultará fácilmente evidente a partir de una comparación entre la secuencia de TIF1 y estas secuencias humanizadas.

15 En consecuencia, al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de "identidad de secuencia" (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente,

20 Preferentemente, al menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo que consiste en secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente.

30 Lo más preferentemente, las tres secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1), o del grupo de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente.

45 Aún más preferentemente, al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se elige adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1). Preferentemente, en esta realización, al menos una o preferentemente ambas de las otras dos secuencias de CDR presentes se eligen adecuadamente de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o se eligen adecuadamente del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente.

50 Aún más preferentemente, al menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se eligen adecuadamente del grupo que consiste en la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir, las secuencias de CDR presentes en el clon TNF1). Preferentemente, en esta realización, la secuencia de CDR restante presente se elige adecuadamente del grupo de secuencias de CDR que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente; y/o del grupo que consiste en secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solo 1 diferencia(s)



de aminoácido con la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente.

5 Nanocuerpos particularmente preferidos comprenden la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 232, y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 300, respectivamente (es decir, la secuencias de CDR presentes en el clon TNF1).

10 Los nanocuerpos con las secuencias de CDR anteriores preferentemente tienen secuencias de entramado que son como se definen adicionalmente en el presente documento. Algunas combinaciones particularmente preferidas, pero no limitativas, de las secuencias de entramado se pueden observar en la tabla I anterior. Como será evidente para el experto, habitualmente se preferirá una combinación de las secuencias de FR1, FR2, FR3 y FR4 que se producen en el mismo clon (es decir, secuencias de FR1, FR2, FR3 y FR4 que se mencionan en la misma línea de la tabla I) (aunque la invención en su sentido más amplio no se limita a lo mismo, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias de entramado mencionadas en la tabla I).

15 Más específicamente

20 XXXVIII) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
- 25 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
- 30 - una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;

y

35 b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 40 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;

45 y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 50 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 55 - una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

- Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY.

60 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), en el que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.

- Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), en el que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.

65 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), en el que:

## ES 2 778 123 T3

- CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 5 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 10 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 15 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), en el que
- 20 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).
- Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que es un nanocuerpo de clase GLEW.
- 25 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14), 95 (TNF29) o 96 (TNF30).
- 30 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que es un nanocuerpo humanizado.
- 35 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.
- Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s); o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 40 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo  $V_{HH}$  3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 45 - Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- Un nanocuerpo según el punto XXXVIII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 50 XXXIX) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que
- 55 a) CDR1 es:
- la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
- 60 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DYWMY; o
- una secuencia de aminoácidos que solo tiene 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos DYWMY;
- 65

y en el que:

b) CDR 2 es:

- 5 - la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 10 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG;

y en el que

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 20 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- 25 - una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY.
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), en el que CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG.
- 30 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), en el que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), en el que:
- 35 - CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN; o
- CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; o
- 40 - CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- 45 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos DYWMY; CDR2 es la secuencia de aminoácidos EINTNGLITKYPDSVKG y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SPSGFN.
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), en el que:
- 50 - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).
- 55 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que es un nanocuerpo de clase GLEW.
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que contiene un residuo de arginina (R) en la posición 103.
- 60 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 (TNF1), 76 (TNF13), 77 (TNF14); 95 (TNF29) o 96 (TNF30).
- 65 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que es un nanocuerpo humanizado.

- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que contiene un residuo de leucina (L) en la posición 108.
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s); o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 5 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3) del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo  $V_{HH}$  3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 10 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3) del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 15 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3) del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 20 - Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que se elige del grupo que consiste en TNF 13 (SEQ ID NO: 76), TNF 14 (SEQ ID NO: 77), TNF 29 (SEQ ID NO: 95) y TNF 30 (SEQ ID NO: 96).
- Un nanocuerpo según el punto XXXIX), que es TNF 30 (SEQ ID NO: 96);  
siendo algunos otros aspectos preferidos:
- 25 XL) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en un nanocuerpo según los puntos XXXVIII) o XXXIX).
- 30 XLI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un nanocuerpo según los puntos XXXVIII) o XXXIX),
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX).
- 35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.
- 40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), que están unidos directamente entre sí o unidos entre sí por medio de un ligador.
- 45 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), que están unidos entre sí por medio de una secuencia de aminoácidos.
- 50 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), que están unidos entre sí por medio de una secuencia de aminoácidos (tal como, sin limitación, una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de serina y glicina) que comprende al menos 14 aminoácidos, más preferentemente al menos 17 aminoácidos, tal como aproximadamente 20-40 aminoácidos (tal como el ligador GS30).
- 55 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 7 (SEQ ID NO: 73), en el que ambos nanocuerpos TNF 1 se han humanizado.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 55 (SEQ ID NO: 419) o TNF 56 (SEQ ID NO: 420).
- 60 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que está pegilado.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la
- 65

transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor; y/o que es tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF, y tal proteína o polipéptido comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

5 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), y tal proteína o polipéptido comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que los dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX) están unidos entre sí por medio de al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y en el que los dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX) o bien están unidos directamente al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, o bien están unidos al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana por medio de un ligador.

15 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), y tal proteína o polipéptido comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que los dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX) están unidos entre sí por medio del al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y en el que los dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX) o bien están unidos directamente al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, o bien están unidos al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana por medio de un ligador, en el que el ligador es una secuencia de aminoácidos (tal como, sin limitación, un ligador que comprende residuos de serina y glicina), y en particular una secuencia de aminoácidos que comprende entre 3 y 40 residuos de aminoácido, tal como entre 5 y 15 residuos de aminoácido (tal como el ligador GS9).

25 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX), y tal proteína o polipéptido comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, en el que los dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX) están unidos entre sí por medio del al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, y en el que los dos nanocuerpos según los puntos XXXVIII) o XXXIX) o bien están unidos directamente al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana, o bien están unidos al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana por medio de un ligador, y que la proteína o polipéptido es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor; y/o que la proteína o polipéptido es tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.

40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), en el que al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

45 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige de un grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).

50 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

55 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos humanizados según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI) y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

60 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF24 (SEQ ID NO: 90), en el que tanto el nanocuerpo TNF 1 como el nanocuerpo ALB 1 se han humanizado.

65 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos TNF 30 y un nanocuerpo ALB 8.

70 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 60 (SEQ ID NO: 417).

75 Debe observarse que cuando un nanocuerpo se menciona anteriormente que es "según el punto XXXVIII" o "según el punto XXXIX", es al menos según uno de los puntos XXXVIII) y/o XXXIX), y también puede incluir una cualquiera o más de los otros aspectos que se indican que son "según el punto XXXVIII" o "según el punto XXXIX" anteriormente. De modo similar, cuando una proteína o polipéptido se menciona anteriormente que es "según uno cualquiera de los

puntos XL) o XLI)", es al menos según uno de los puntos XL) a XLI), puede ser según dos o más de los puntos VI) a XVIII), y también puede incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son "según uno cualquiera de los puntos XL) o XLI) anteriores".

5 Para los nanocuerpos basados en el nanocuerpo TNF1 anterior (incluyendo, pero sin limitarse a, los nanocuerpos humanizados), las secuencias de entramado pueden ser generalmente tal como se describe en el presente documento, y preferentemente son de la siguiente manera:

10 a) FR1 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130;

20 y

b) FR2 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198;

y

35 c) FR3 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 266; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 266; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 266.

45

y

d) FR4 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 334; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 334; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 334;

50

55

60 en las que las diferencias de aminoácidos presentes en las secuencias de entramado son más preferentemente tal como se describe en el presente documento.

65 Los nanocuerpos contra TNF-alfa, que tienen regiones de entramado tal como se describió anteriormente (es decir, similares a TNF1), y en los que al menos una de las regiones de entramado (tal como dos cualesquiera, tres cualesquiera o las cuatro regiones de entramado) se han humanizado, forman un aspecto adicional de la invención. Tales nanocuerpos pueden tener en particular CDR que son tales que el nanocuerpo tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s); y/o tienen CDR que son tales que el nanocuerpo

tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo V<sub>HH</sub> 3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; y en particular mejor que 12 nM, más en particular mejor que 5 nM, incluso más en particular mejor que 3 nM. Asimismo, o alternativamente, tales nanocuerpos se dirigen preferentemente contra el mismo epítipo de TNF (es decir, el trímero de TNF) que TNF1.

En particular, la invención se refiere a un nanocuerpo contra TNF-alfa, que es una variante humanizada de un nanocuerpo contra TNF-alfa, nanocuerpo contra TNF-alfa que tiene las siguientes secuencias de entramado: FR1: SEQ ID NO: 130; FR2: SEQ ID NO: 198; FR3: SEQ ID NO: 266; y FR4: SEQ ID NO: 334. Tal nanocuerpo puede tener en particular CDR que son tales que el nanocuerpo tiene una velocidad de K<sub>off</sub> para TNF mejor que 2·10<sup>-3</sup> (1/s), preferentemente mejor que 1·10<sup>-3</sup> (1/s); y/o tener CDR que son tales que el nanocuerpo tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo V<sub>HH</sub> 3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; y en particular mejor que 12 nM, más en particular mejor que 5 nM, incluso más en particular mejor que 3 nM. Asimismo, o alternativamente, tales nanocuerpos se dirigen preferentemente contra el mismo epítipo de TNF (es decir, el trímero de TNF) que TNF1.

Otro clon que se ha hallado que es particularmente útil como nanocuerpo anti-TNF es el clon PMP5F10 (TNF3, SEQ ID NO: 60). Como puede observarse a partir de los datos comparativos del ensayo de KYM en la tabla 39, TNF3 tiene un valor de EC50 que es más de 15 veces mejor que el mejor nanocuerpo monovalente descrito en el documento WO 04/41862.

Por consiguiente, los nanocuerpos que comprenden una o más, preferentemente dos cualesquiera y más preferentemente las tres de las CDR presentes en el clon PMP5F10 (o secuencias de CDR que derivan de las mismas o corresponden a las mismas) se prefieren particularmente en la invención. Asimismo, estos nanocuerpos pertenecen preferentemente a la clase KERE.

Más específicamente, algunos aspectos preferidos son:

XLII) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que

a) CDR1 comprende:

- la secuencia de aminoácidos NYVMG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NYVMG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NYVMG;

y

b) CDR2 comprende:

- la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYKDSVKG;

y

c) CDR3 comprende:

- la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- 5 - Un nanocuerpo según el punto XLII), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG.
- Un nanocuerpo según el punto XLII), en el que CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG.
- 10 - Un nanocuerpo según el punto XLII), en el que CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- Un nanocuerpo según el punto XLII), en el que:
  - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o
  - 15 - CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o
  - 20 - CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.
- Un nanocuerpo según el punto XLII), en el que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos NYVMG; CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ILPLSDDPGWNTY.
- 25 - Un nanocuerpo según el punto XLII), en el que
  - cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o
  - 30 - dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).
- Un nanocuerpo según el punto XLII), que es un nanocuerpo de clase KERE.
- 35 - Un nanocuerpo según el punto XLII), que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) o 99 (TNF33).
- 40 - Un nanocuerpo según el punto XLII), que es un nanocuerpo humanizado.
  - Un nanocuerpo según el punto XLII), que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s); o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 45 - Un nanocuerpo según el punto XLII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo  $V_{HH}$  3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 50 - Un nanocuerpo según el punto XLII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
  - Un nanocuerpo según el punto XLII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 55 - Un nanocuerpo según el punto XLII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- XLIII) Un nanocuerpo contra TNF-alfa, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que
  - 60 a) CDR1 es:
    - la secuencia de aminoácidos NYVMG; o
    - 65 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la



secuencia de aminoácidos NYVMG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NYVMG;

5

y

b) CDR2 es:

10

- la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o

15

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG;

y

20

c) CDR3 es:

- la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o

25

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o

30

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG.

35

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), en el que CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG.

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), en el que CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), en el que:

40

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY; o

- CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; y CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; o

45

- CDR2 es la secuencia de aminoácidos NISWRGYNIYYKDSVKG; y CDR3 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY.

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), en el que CDR1 es la secuencia de aminoácidos NYVMG; CDR2 es la secuencia de aminoácidos SILPLSDDPGWNTY y CDR3 es la secuencia de aminoácidos ILPLSDDPGWNTY.

50

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), en el que

- cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa; y/o

55

- dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), que es un nanocuerpo de clase KERE.

60

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 50 (TNF3), 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) o 99 (TNF33).

65

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), que es un nanocuerpo humanizado.

- Un nanocuerpo según el punto XLIII), que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s); o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 5 - Un nanocuerpo según el punto XLIII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo  $V_{HH}$  3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 10 - Un nanocuerpo según el punto XLIII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- Un nanocuerpo según el punto XLIII), que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM; o una variante humanizada de tal nanocuerpo.
- 15 - Un nanocuerpo según el punto XLIII), que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO 83 (TNF20), 85 (TNF21), 85 (TNF22), 96 (TNF23) o 98 (TNF33), TNF 13 (SEQ ID NO: 76), TNF 14 (SEQ ID NO: 77), TNF 29 (SEQ ID NO: 95) y TNF 30 (SEQ ID NO: 96)
- 20 siendo algunos otros aspectos preferidos:
- XLIV) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en un nanocuerpo según los puntos XLII) o XLIII).
- 25 XLV) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un nanocuerpo según los puntos XLII) o XLIII).
- XLVI) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según los puntos XLII) o XLIII).
- 30 XLVII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según los puntos XLII) o XLIII), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.
- 35 XLVIII) Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según los puntos XLII) o XLIII), y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.
- 40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 6 (SEQ ID NO: 72) o TNF 9 (SEQ ID NO: 75), en el que ambos nanocuerpos TNF 3 se han humanizado.
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), que está pegilado.
- 45 - Una proteína o polipéptido, que comprende dos nanocuerpos según los puntos XLII) o XLIII), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor; y/o que es tal que dicha proteína o polipéptido es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF, y proteína o polipéptido que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.
- 50 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.
- 55 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).
- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).
- 60 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.
- 65

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos humanizados según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII) y una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

5 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF26 (SEQ ID NO: 92), en el que tanto los nanocuerpos TNF 3 como el nanocuerpo ALB 1 se han humanizado.

10 Debe observarse que cuando un nanocuerpo se menciona anteriormente que es “según el punto XLII” o “según el punto XLIII”, es al menos según uno de los puntos XLII) y/o XLIII), y también puede incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son “según el punto XLII)” o “según el punto XLIII)” anteriormente. De modo similar, cuando una proteína o polipéptido se menciona anteriormente que es “según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII)”, es al menos según uno de los puntos XL) a XLI), puede ser según dos o más de los puntos XLIV) a XLVIII), y también puede incluir uno cualquiera o más de los otros aspectos que se indica que son “según uno cualquiera de los puntos XLIV) o XLVIII) anteriores”.

15 Para los nanocuerpos basados en el nanocuerpo TNF3 anterior (incluyendo, pero sin limitarse a, los nanocuerpos humanizados), las secuencias de entramado pueden ser generalmente tal como se describe en el presente documento, y preferentemente son de la siguiente manera:

20 a) FR1 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138; o

25 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138; o

30 - una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138;

y

35 b) FR2 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206; o

40 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206;

45 y

c) FR3 comprende o es:

50 - la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274; o

55 - una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274;

y

60 d) FR4 comprende o es:

- la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 342; o

65 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 342; o

- una secuencia de aminoácidos que tiene solo 1 diferencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 342;

5 en las que las diferencias de aminoácidos presentes en las secuencias de entramado son más preferentemente tal como se describe en el presente documento.

10 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un nanocuerpo con una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 52 a 60, del grupo que consiste en SEQ ID NO: 76 a 86, del grupo que consiste en SEQ ID NO: 95 a 99, del grupo que consiste en SEQ ID NO 105 a 129 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen más del 80%, preferentemente más del 90%, más preferentemente 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 aminoácidos de SEQ ID NO: 52 a 60, SEQ ID NO: 76 a 86, SEQ ID NO: 95 a 99 o SEQ ID NO 105 a 129, en el que estas últimas secuencias de aminoácidos tienen lo más preferentemente secuencias de entramado que son tal como se definen adicionalmente a continuación en la descripción general de las secuencias de entramado de nanocuerpos.

20 Según una realización específica, pero no limitativa, estas últimas secuencias de aminoácidos están "humanizadas", tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

25 Lo más preferentemente, los nanocuerpos se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 52 a 60, del grupo que consiste en SEQ ID NO: 76 a 86, del grupo que consiste en SEQ ID NO: 95 a 99, o del grupo que consiste en SEQ ID NO 105 a 129, de los cuales pueden preferirse particularmente los nanocuerpos "humanizados" de SEQ ID NO 76 a 86 y SEQ ID NO: 95 a 99.

30 Tal como se mencionó anteriormente, un nanocuerpo particularmente preferido es el clon PMP1C2 (TNF1; SEQ ID NO: 52). Por tanto, en un aspecto preferido, la invención se refiere a un nanocuerpo con una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 52 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen más del 80%, preferentemente más del 90%, más preferentemente más del 95%, tal como el 99% o más de "identidad de secuencia" (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, en el que estas últimas secuencias de aminoácidos tienen lo más preferentemente secuencias de entramado que son tal como se definen adicionalmente a continuación en la descripción general de las secuencias de entramado de nanocuerpos.

35 Se prefieren particularmente variantes humanizadas del clon PMP1C2 (TNF1; SEQ ID NO: 52). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales variantes humanizadas son los clones TNF13 (SEQ ID NO: 76), TNF14 (SEQ ID NO: 77), TNF29 (SEQ ID NO: 95) y TNF 30 (SEQ ID NO: 96). Por tanto, en un aspecto preferido, la divulgación se refiere a un nanocuerpo humanizado con una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 76, 77, 95 o 96, o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen más del 80%, preferentemente más del 90%, más preferentemente más del 95%, tal como el 99% o más de "identidad de secuencia" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, 77, 95 o 96, en el que estas últimas secuencias de aminoácidos tienen lo más preferentemente secuencias de entramado que son tal como se definen adicionalmente a continuación en la descripción general de las secuencias de entramado de nanocuerpos.

45 Según una realización preferida, el nanocuerpo es una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1 (SEQ ID NO: 52). Algunos aspectos preferidos son:

50 XLIX) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1, que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s).

L) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo  $V_{HH}$  3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo.

55 LI) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM.

60 LII) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM.

LIII) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un nanocuerpo que es una variante humanizada del nanocuerpo TNF 1 según uno cualquiera de los puntos XLIX) a LII).

65 LIV) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 1 según uno cualquiera de los puntos XLIX) a LII) (opcionalmente unidos por medio

de un ligador),

5 LV) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF1 según uno cualquiera de los puntos XLIX) a LII) (opcionalmente unidos por medio de un ligador), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal está mediada por tal reticulación del receptor.

10 LVI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF1 según uno cualquiera de los puntos XLIX) a LII) y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

15 LVII) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF7 (SEQ ID NO: 73), en el que ambos nanocuerpos TNF1 se han humanizado.

LVIII) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF7 (SEQ ID NO: 73), en el que ambos nanocuerpos TNF1 se han humanizado, y que está pegilado.

20 LIX) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 1 según uno cualquiera de los puntos XLIX) a LII) y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

25 LX) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 1 según uno cualquiera de los puntos XLIX) a LII), que están unidos cada uno (opcionalmente unidos por medio de un ligador) a un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LIII) a LX), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.

30 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LIII) a LX), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

35 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LIII) a LX), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).

40 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LIII) a LX), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LIII) a LX), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF24 (SEQ ID NO: 90), en el que tanto el nanocuerpo TNF 1 como el nanocuerpo ALB TNF 1 se han humanizado.

45 - Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LIII) a LX), que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos TNF 30 y un nanocuerpo ALB 8.

Según una realización preferida, el nanocuerpo de la invención es una variante humanizada del nanocuerpo TNF 3 (SEQ ID NO: 60).

50 Algunos aspectos preferidos de esta realización de la invención son:

55 LXI) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 3, que tiene una velocidad de  $K_{off}$  para TNF mejor que  $2 \cdot 10^{-3}$  (1/s), preferentemente mejor que  $1 \cdot 10^{-3}$  (1/s).

LXII) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 3, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 del nanocuerpo V<sub>HH</sub> 3E (SEQ ID NO: 4) del documento WO 04/041862 en el mismo ensayo.

60 LXIII) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 3, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 5 nM.

LXIV) Una variante humanizada del nanocuerpo TNF 3, que tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 3 nM.

65 LXV) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en al menos un nanocuerpo que es una

variante humanizada del nanocuerpo TNF 3 según uno cualquiera de los puntos LXI) a LXIV).

LXVI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 3 según uno cualquiera de los puntos LXI) a LXIV) (opcionalmente unidos mediante un ligador).

LXVII) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 3 según uno cualquiera de los puntos LXI) a LXIV) (opcionalmente unidos mediante un ligador), y que es tal que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por tal reticulación del receptor.

LXVIII) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 3 según uno cualquiera de los puntos LXI) a LXIV) y que es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF.

LXIX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 6 (SEQ ID NO: 72) o TNF 9 (SEQ ID NO: 75), en el que ambos nanocuerpos TNF 3 se han humanizado.

LXX) Una proteína o polipéptido que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF 6 (SEQ ID NO: 72) o TNF 9 (SEQ ID NO: 75), en el que ambos nanocuerpos TNF 3 se han humanizado, y que está pegilado.

LXXI) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 3 según uno cualquiera de los puntos LXI) a LXIV), y que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

LXXII) Una proteína o polipéptido, que comprende o consiste esencialmente en dos nanocuerpos que son variantes humanizadas del nanocuerpo TNF 3 según uno cualquiera de los puntos LXI) a LXIV), que están unidos cada uno (opcionalmente unidos mediante un ligador) a un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LXV) a LXXII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es un nanocuerpo humanizado.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LXV) a LXXII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es una variante humanizada del nanocuerpo ALB 1 (SEQ ID NO: 63).

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LXV) a LXXII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en ALB 3 (SEQ ID NO: 87), ALB 4 (SEQ ID NO: 88), ALB 5 (SEQ ID NO: 89), ALB 6 (SEQ ID NO: 100), ALB 7 (SEQ ID NO: 101), ALB 8 (SEQ ID NO: 102), ALB 9 (SEQ ID NO: 103) y ALB 10 (SEQ ID NO: 104).

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LXV) a LXXII), en el que el al menos un nanocuerpo dirigido contra albúmina sérica humana es ALB 8.

- Una proteína o polipéptido según uno cualquiera de los puntos LXV) a LXXII), que comprende o consiste esencialmente en el polipéptido TNF26 (SEQ ID NO: 92), en el que tanto los nanocuerpos TNF 3 como el nanocuerpo ALB 1 se han humanizado.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido que comprende o consiste esencialmente en al menos un nanocuerpo contra TNF-alfa tal como se define en el presente documento. Tales polipéptidos también se denominan en el presente documento "polipéptidos de la invención" y pueden ser tal como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento y/o tal como se describe generalmente en el documento WO 04/041862 para los nanocuerpos divulgados en el mismo y, por ejemplo, pueden ser polipéptidos multivalentes o polipéptidos multiespecíficos, de nuevo tal como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento.

Preferentemente, un polipéptido de la invención es o bien bivalente o trivalente (es decir, que comprende dos o tres nanocuerpos, respectivamente, opcionalmente unidos por medio de uno o dos ligadores como se define más adelante, respectivamente) o bien un polipéptido multiespecífico, que comprende uno o dos, y preferentemente dos, nanocuerpos de la invención y al menos un nanocuerpo dirigido contra una proteína sérica, y en particular contra una proteína sérica humana, tal como contra albúmina sérica humana.

En una realización preferida, pero no limitativa, los nanocuerpos presentes en los polipéptidos se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 52 a 60 y SEQ ID NO 105-129 o de variantes humanizadas de los mismos, y en particular de los nanocuerpos "humanizados" de SEQ ID NO 76 a 86 y SEQ ID NO: 95 a 99. Los nanocuerpos contra albúmina sérica humana presentes en los polipéptidos de la invención son preferentemente tal como se define a continuación, y más preferentemente se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 61 a 67, SEQ ID NO: 87 a 89 y SEQ ID NO:

100-104, y en particular de los nanocuerpos "humanizados" contra albúmina sérica humana de SEQ ID NO 76 a 86 y SEQ ID NO 100-104.

5 Tal como se menciona en el presente documento, los nanocuerpos y constructos descritos en el presente documento pueden estar pegilados, o contener uno o más residuos de aminoácido (adicionales) que permiten la pegilación y/o facilitan la pegilación. Dos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales polipéptidos son TNF55 y TNF56, ambos de los cuales contienen un residuo de cisteína adicional para la unión sencilla de un grupo PEG.

10 Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de polipéptidos son los polipéptidos bivalentes de la invención de SEQ ID NO: 70 a 75 y los polipéptidos multiespecíficos de la invención de SEQ ID NO: 90 a 94 y SEQ ID NO 417 a 420.

15 Tal como se puede observar a partir de los datos representados a continuación, y en particular de los datos facilitados en el ejemplo comparativo, los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención tienen propiedades mejoradas. En particular, las proteínas y polipéptidos de la invención pueden tener afinidad mejorada por TNF-alfa humana (expresada como el valor de EC50 en el ensayo de KYM descrito en el presente documento), en comparación con los productos biológicos anti-TNF disponibles comercialmente Enbrel™, Humira™ y Remicade™. Asimismo, los nanocuerpos descritos en el presente documento pueden tener una afinidad mejorada por TNF-alfa en comparación con el nanocuerpo que mejor funciona descrito en la solicitud internacional WO 04/041862. En consecuencia, se puede esperar que los polipéptidos de la invención que comprenden al menos uno de los nanocuerpos de la invención también tendrá propiedades mejoradas en comparación con polipéptidos que comprenden solo los nanocuerpos contra TNF-alfa descritos en el documento WO 04/041862.

25 Más en particular, un polipéptido tal como se describe en el presente documento que comprende dos o más (y preferentemente dos) nanocuerpos como en el presente documento (y opcionalmente por ejemplo un nanocuerpo contra albúmina sérica humana), tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que el valor de EC50 de Humira® y Remicade®, y preferentemente también mejor que Enbrel® en el mismo ensayo.

30 Por ejemplo, tal proteína o polipéptido preferentemente tiene un valor de EC50 en el ensayo basado en células usando células KYM descrito en el ejemplo 1, en 3), del documento WO 04/041862 que es mejor que 0,2 nM, preferentemente mejor que 0,1 nM, tal como mejor que 0,7 nM y en particular mejor que 0,4 nM.

35 Los solicitantes también han demostrado que los nanocuerpos contra TNF-alfa de ratón y los polipéptidos que comprenden nanocuerpos contra TNF-alfa de ratón muestran una actividad biológica beneficiosa en los siguientes modelos de enfermedad (datos no mostrados):

40 - El modelo de dextrano-sulfato de sodio ("DSS") de colitis, usando tanto ratones regulares como ratones deficientes en IL-10, tal como se describe por Okayasu *et al* (Gastroenterol 1990, 98(3):694);

- El modelo de artritis inducida por colágeno ("AIC") de artritis ("AR"), tal como se describe por Courtenay *et al*. (Nature 1980, 283(5748): 666), usando tanto ratones regulares como ratones deficientes en IL-10;

45 - El modelo del ratón deficiente en IL-10 de EII, tal como se describe, por ejemplo, por Rennick *et al* (Clin Immunol Immunopathol 1995, 76(3 Pt 2): S 174);

- El modelo Kollias de AR, tal como se describe, por ejemplo, por Keffer *et al*. (EMBO J 1991, 10(13): 4025);

50 - El modelo de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico ("TNBS") de EII, tal como se describe por Elson *et al*. (J Immunol 1996, 157(5): 2174);

- El modelo de AIC de AR, descrito por Koppieters *et al* (manuscrito en preparación);

55 - El modelo de fibroblasto derivado de líquido sinovial (descrito más adelante); y

- El modelo de bolsa de aire murino.

60 Preferentemente, los nanocuerpos descritos en el presente documento son mejores que el nanocuerpo 1A del documento WO 04/041862 en al menos uno de estos modelos, y preferentemente en todos estos modelos; y con más preferencia son mejores que el nanocuerpo 3E del documento WO 04/041862 en al menos uno de estos modelos, y preferentemente en todos estos modelos. Asimismo, los polipéptidos descritos en el presente documento son preferentemente equivalentes a o mejores que Humira® o Remicade® en al menos uno de estos modelos, y preferentemente en todos estos modelos; y más preferentemente también equivalentes a o mejores que Enbrel® en al menos uno de estos modelos, y preferentemente en todos estos modelos.

65 Estos datos confirman que los nanocuerpos contra TNF-alfa y los polipéptidos que contienen los mismos, tales como

los nanocuerpos y polipéptidos descritos en el documento WO 04/041862 y en particular los nanocuerpos y polipéptidos descritos en el presente documento, deben tener eficacia terapéutica contra enfermedades y trastornos mediados por TNF, tales como las enfermedades y los trastornos mencionados anteriormente.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para un nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención. Tal ácido nucleico también se denominará a continuación "ácido nucleico de la invención" y por ejemplo puede estar en forma de un constructo genético, como se define más adelante.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un huésped o célula huésped que expresa o es capaz de expresar un nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención; y/o que contiene un ácido nucleico que codifica para un nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención. Tal huésped o célula huésped también puede ser análogo a los huéspedes y células huésped descritos en el documento WO 04/041862, pero que expresan o son capaces de expresar un nanocuerpo de la invención y/o un polipéptido de la invención y/o que contienen un ácido nucleico tal como se describe en el presente documento.

15 La invención también se refiere a un producto o composición que contiene o que comprende un nanocuerpo de la invención, un polipéptido de la invención; y/o un ácido nucleico de la invención. Tal producto o composición por ejemplo puede ser una composición farmacéutica (tal como se describe a continuación) o un producto o composición para uso de diagnóstico (como también se describe a continuación). Tal producto o composición también puede ser análogo a los productos y composiciones descritos en el documento WO 04/041862, pero que contiene o que comprende un nanocuerpo de la invención, un polipéptido de la invención o un ácido nucleico de la invención.

20 La invención también se refiere a métodos para preparar o generar los nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones de la invención, métodos que son tal como se describe adicionalmente a continuación. Asimismo, generalmente, los nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento también se pueden preparar y usar de una manera análoga a la manera descrita en el documento WO 04/041862.

25 La invención también se refiere a aplicaciones y usos de los nanocuerpos de la invención, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento, aplicaciones y usos que incluyen, pero no se limitan a, las aplicaciones y usos descritos más adelante en el presente documento y/o los usos y aplicaciones adicionales para nanocuerpos contra TNF-alfa y/o para polipéptidos que contienen los mismos en el documento WO 04/041862.

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

### Descripción detallada de la invención

40 Los aspectos y realizaciones anteriores y otros de la invención serán evidentes a partir de la descripción adicional más adelante en el presente documento, en la que:

45 a) A menos que se indique o defina lo contrario, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, 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, R.U. (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como los antecedentes generales de la técnica mencionados en el presente documento;

55 b) 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 un término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos de del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a, dominios de unión a antígeno o fragmentos tales como dominios V<sub>HH</sub> o dominios V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>, respectivamente). Además, el término "secuencia" tal como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia del anticuerpo", "secuencia del dominio variable", "secuencia de V<sub>HH</sub>" o "secuencia de proteína"), se deben entender generalmente como que incluyen tanto las secuencias de aminoácidos relevantes así como secuencias de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican para las mismas, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada;

65 c) A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida en sí misma, como será



evidente para el experto. De nuevo se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, a los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente y a las referencias adicionales citadas en los mismos;

- 5 d) Los residuos de aminoácido se indicarán según los códigos de aminoácidos tres letras o de una letra convencionales, mencionados en la tabla 1;

Tabla 1: Códigos de aminoácidos de una letra y de tres letras

No polar, no cargado (a pH 6,0-7,0) <sup>(3)</sup>	Alanina	Ala	A
	Valina	Val	V
	Leucina	Leu	L
	Isoleucina	Ile	I
	Fenilalanina	Phe	F
	Metionina <sup>(1)</sup>	Met	M
	Triptófano	Trp	W
Prolina	Pro	P	
Polar, no cargado (a pH 6,0-7,0)	Glicina <sup>(2)</sup>	Gly	G
	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Cisteína	Cys	C
	Asparagina	Asn	N
	Glutamina	Gln	Q
Tirosina	Tyr	Y	
Polar, cargado (a pH 6,0-7,0)	Lisina	Lys	K
	Arginina	Arg	R
	Histidina <sup>(4)</sup>	His	H
	Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E	
Notas: (1) También considerado algunas veces como un aminoácido polar no cargado. (2) También considerado algunas veces como un aminoácido no polar no cargado (3) Como será evidente para el experto, el hecho de que un residuo de aminoácido se mencione en esta tabla como cargado o no cargado a pH de 6,0 a 7,0 no se refleja de ninguna manera en la carga que puede tener dicho residuo de aminoácido a un pH menor que 6,0 y/o a un pH mayor que 7,0, los residuos de aminoácido mencionados en esta tabla pueden estar cargados y/o no cargados a tal pH mayor o menor, como será evidente para el experto. (4) Tal como se conoce en la técnica, la carga de un residuo de His depende en gran medida incluso de pequeños cambios de pH, pero generalmente un residuo de His se puede considerar esencialmente no cargado a un pH de aproximadamente 6,5.			

- 10 e) Con propósitos de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos se puede calcular dividiendo [el número de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos] entre [el número total de nucleótidos en la primera
- 15 secuencia de nucleótidos] y multiplicando por [100%], en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos, en comparación con la primera secuencia de nucleótidos, se considera como una diferencia en un único nucleótido (posición).

20 Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos se puede calcular usando un algoritmo informático conocido para el alineamiento de secuencias tal como NCBI Blast v2.0, usando ajustes convencionales.

25 Algunas otras técnicas, algoritmos informáticos y ajustes para determinar el grado de identidad de secuencia se describen, por ejemplo, en los documentos WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00155318, WO 00178972, WO 98149185 y GB 2 357 768-A.

30 Habitualmente, con el propósito de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias de nucleótidos está según el método de cálculo expuesto anteriormente en el presente documento, la secuencia de nucleótidos con el mayor número de nucleótidos se tomará como la "primera" secuencia de nucleótidos, y la otra secuencia de nucleótidos se tomará como la "segunda" secuencia de nucleótidos;

- f) Con propósitos de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos se puede calcular dividiendo [el número de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de

aminoácido en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos] entre [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicando por [100%], en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la primera secuencia de aminoácidos, se considera como una diferencia en un único residuo de aminoácido (posición), es decir como una “diferencia(s) de aminoácido” tal como se define más adelante.

Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede calcular usando un algoritmo informático, tal como los mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad de secuencia para secuencias de nucleótidos, de nuevo usando ajustes convencionales.

Habitualmente, con el propósito de determinar el porcentaje de la “identidad de secuencia” entre dos secuencias de aminoácidos según el método del cálculo expuesto anteriormente en el presente documento, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos de aminoácido se tomará como la “primera” secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará la “segunda” secuencia de aminoácidos.

Asimismo, para determinar el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, el experto puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos “conservativas”, que en general se pueden describir como sustituciones de aminoácidos en las que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones de aminoácidos conservativas se conocen bien en la técnica, por ejemplo a partir de los documentos WO 04/037999, GB-A-2 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y tipos y/o combinaciones (preferidos) de tales sustituciones se pueden seleccionar basándose en las enseñanzas pertinentes del documento WO 04/037999 así como del documento WO 98/49185 y de las referencias adicionales citadas en los mismos.

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

Las sustituciones conservativas particularmente preferidas son las siguientes: Ala por Gly o por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o por His; Asp por Glu; Cys por Ser; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Ala o por Pro; His por Asn o por Gln; Ile por Leu o por Val; Leu por Ile o por Val; Lys por Arg, por Gln o por Glu; Met por Leu, por Tyr o por Ile; Phe por Met, por Leu o por Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp; y/o Phe por Val, por Ile o por Leu.

Cualquiera de las sustituciones de aminoácidos aplicadas a los polipéptidos descritos en el presente documento también se pueden basar en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrollado por Schulz *et al.*, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de potenciales formadores de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, y en el análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollado por Eisenberg *et al.*, Proc. Nad. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 1981, y Goldman *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986, todos incorporados en el presente documento en su totalidad por referencia. La información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de nanocuerpos facilitada en la descripción en el presente documento y en los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente. Asimismo, con este propósito, la estructura cristalina de un dominio  $V_{HH}$  de una llama se facilita, por ejemplo, por Desmyter *et al.*, Nature Structural Biology, vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli *et al.*, Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; y Decanniere *et al.*, Structure, vol. 7, 4, 361 (1999). Información adicional acerca de algunos de los residuos de aminoácido que en los dominios  $V_H$  convencionales forman la superficie de contacto  $V_H/V_L$  y posibles sustituciones camelizantes en estas posiciones se pueden hallar en la técnica anterior sobre nanocuerpos mencionada en el presente documento;

g) se dice que las secuencias de aminoácidos y secuencias de ácido nucleico son “exactamente iguales” si tienen el 100% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) a lo largo de su longitud completa;

h) cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término “diferencia de aminoácido” se refiere a una inserción, delección o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia, en comparación con la segunda secuencia; entendiéndose que dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o más de tales diferencias de aminoácidos;

i) se considera que una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos está “(en forma) esencialmente aislada”, por ejemplo, en comparación con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo del cual se ha obtenido, cuando se ha separado de al menos otro componente con el que está habitualmente asociada en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente menor. En particular, una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos se considera “esencialmente aislada” cuando se ha purificado al menos 2 veces,

en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Preferentemente una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que está “en forma esencialmente aislada” es esencialmente homogénea, tal como se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica de cromatografía adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida;

j) El término “dominio” tal como se usa en el presente documento se refiere en general a una región globular de una cadena de anticuerpo, y en particular a una región globular de un anticuerpo de cadena pesada, o a un polipéptido que consiste esencialmente en tal región globular. Habitualmente, tal dominio comprenderá bucles de péptidos (por ejemplo, 3 ó 4 bucles de péptidos) estabilizados, por ejemplo, como una lámina o mediante enlaces disulfuro.

k) El término “determinante antigénico” se refiere al epítipo en el antígeno reconocido por la molécula de unión a antígeno (tal como un nanocuerpo o un polipéptido de la invención) y más en particular por el sitio de unión a antígeno de dicha molécula. Los términos “determinante antigénico” y “epítipo” también pueden usarse de modo intercambiable.

l) Una secuencia de aminoácidos (tal como un nanocuerpo, un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o generalmente una proteína o polipéptido de unión a antígeno o fragmento de los mismos) que se puede unir a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína específico (o por al menos una parte, fragmento o epítipo de los mismos) se dice que es “contra” o está “dirigido contra” dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

m) El término “especificidad” se refiere al número de tipos diferentes de antígenos o determinantes antigénicos a los que se puede unir una molécula de unión a antígeno o molécula de proteína de unión a antígeno particular (tal como un nanocuerpo o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno se puede determinar basándose en la afinidad y/o avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno ( $K_D$ ), es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor es el valor de la  $K_D$ , mayor es la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión a antígeno (alternativamente, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad ( $K_A$ ), que es  $1/K_D$ ). Como será evidente para el experto (por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en el presente documento), la afinidad se puede determinar de una manera conocida en sí misma, dependiendo del antígeno específico de interés. La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un nanocuerpo o polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente. La avidéz está relacionada con la afinidad entre un determinante antigénico y 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 proteínas de unión a antígeno (tales como los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención) se unirán con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos, y preferentemente de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (M) o menos y más preferentemente de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro, y/o con una constante de asociación ( $K_A$ ) de al menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>, preferentemente al menos  $10^8$  M<sup>-1</sup>, más preferentemente al menos  $10^9$  M<sup>-1</sup>, tal como al menos  $10^{12}$  M<sup>-1</sup>. Cualquier valor de  $K_D$  mayor de  $10^{-4}$  generalmente se considera que indica unión no específica. Preferentemente, un nanocuerpo o polipéptido de la invención se unirá al antígeno deseado con una  $K_D$  menor de 500 nM, preferentemente menor de 200 nM, más preferentemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 nM. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico se puede determinar de alguna manera adecuada conocida en sí misma, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas en sí mismas en la técnica.

n) Como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento, la secuencia de aminoácidos y estructura de un nanocuerpo se puede considerar, sin embargo sin limitarse a lo mismo, que está compuesta por cuatro regiones de entramado o “FR”, que se denominan en la técnica y más adelante en el presente documento “región de entramado 1” o “FR1”; “región de entramado 2” o “FR2”; “región de entramado 3” o “FR3”; y “región de entramado 4” o “FR4”, respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad o “CDR”, que se denominan en la técnica “región determinante de la complementariedad 1” o “CDR1”; “región determinante de la complementariedad 2” o “CDR2”; y “región determinante de la complementariedad 3” o “CDR3”, respectivamente;

o) como también se describe adicionalmente más adelante en el presente documento, el número total de residuos de aminoácido en un nanocuerpo puede estar en la región de 110-120, preferentemente 112-115, y lo más preferentemente 113. Sin embargo, se debe indicar que las partes, fragmentos o análogos (tal como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento) de un nanocuerpo no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos o análogos cumplan los requisitos adicionales expuestos más adelante en el presente documento y también sean preferentemente adecuados con los propósitos descritos en el presente documento;

p) los residuos de aminoácido de un nanocuerpo se numeran según la numeración general para los dominios  $V_H$  facilitada por Kabat *et al.* (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), según se aplica a dominios  $V_{HH}$  de *Camelidae* en el artículos de Riechmann y Muyldermans,

mencionado anteriormente (véase por ejemplo la figura 2 de dicha referencia). Según esta numeración, FR1 de un nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 1-30, CDR1 de un nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-36, FR2 de un nanocuerpo comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, FR3 de un nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 66-94, CDR3 de un nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102, y FR4 de un nanocuerpo comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 103-113. [En este aspecto, debe observarse que, como bien se conoce en la técnica para los dominios V<sub>H</sub>- y para los dominios V<sub>HH</sub>, el número total de residuos de aminoácido en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácido indicados por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácido que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración según Kabat puede o puede no corresponder a la numeración real de los residuos de aminoácido en la secuencia real. Sin embargo, generalmente se puede decir que, según la numeración de Kabat e independientemente del número de residuos de aminoácidos en las CDR, la posición 1 según la numeración de Kabat corresponde al comienzo de FR1 y viceversa, la posición 36 según la numeración de Kabat corresponde al comienzo de FR2 y viceversa, la posición 66 según la numeración de Kabat corresponde al comienzo de FR3 y viceversa, y la posición 103 según la numeración de Kabat corresponde al comienzo de FR4 y viceversa].

Métodos alternativos para la numeración de los residuos de aminoácido de dominios V<sub>H</sub>, métodos que también se pueden aplicar de una manera análoga a los dominios V<sub>HH</sub> de *Camelidae* y a nanocuerpos, son el método descrito por Chothia *et al.* (Nature 342, 877-883 (1989)), la denominada "definición por AbM" y la denominada "definición por contacto". Sin embargo, en la presente descripción, reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración según Kabat aplicada a dominios V<sub>HH</sub> por Riechmann y Muyldermans, a menos que se indique lo contrario; y

q) las figuras, la lista de secuencias y la parte experimental/ejemplos se facilitan solo para ilustrar adicionalmente la invención y no se debe interpretar o analizar como que limitan el alcance de la invención y/o de las reivindicaciones adjuntas de ningún modo, a menos que se indique explícitamente de otro modo en el presente documento.

Para una descripción general de anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables de los mismos, se hace referencia entre otras a las siguientes referencias, que se mencionan como antecedentes generales de la técnica: documentos WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; documentos WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); documento WO 03/050531 de Algonomics N.V. y del solicitante; documento WO 01/90190 del National Research Council of Canada; documento WO 03/025020 (= EP 1 433 793) del Institute of Antibodies; así como documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 del solicitante y las solicitudes de patente publicadas adicionales del solicitante; Hamers-Casterman *et al.*, Nature 3 de junio de 1993; 363 (6428): 446-8; Davies y Riechmann, FEBS Lett. 21 de febrero de 1994; 339(3): 285-90; Muildermans *et al.*, Protein Eng. septiembre de 1994; 7(9): 1129-3; Davies y Riechmann, Biotechnology (NY) mayo de 1995; 13(5): 475-9; Gharoudi *et al.*, 9th Forum of Applied Biotechnology, Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 1995; 60/4a parte I: 2097-2100; Davies y Riechmann, Protein Eng. junio de 1996; 9(6): 531-7; Desmyter *et al.*, Nat Struct Biol. septiembre de 1996; 3(9): 803-11; Sheriff *et al.*, Nat Struct Biol. septiembre de 1996; 3(9): 733-6; Spinelli *et al.*, Nat Struct Biol. septiembre de 1996; 3(9): 752-7; Arbabi Ghahroudi *et al.*, FEBS Lett. 15 de septiembre de 1997; 414(3): 521-6; Vu *et al.*, Mol Immunol. noviembre-diciembre de 1997; 34(16-17): 1121-31; Atarhouch *et al.*, Journal of Camel Practice and Research 1997; 4: 177-182; Nguyen *et al.*, J. Mol. Biol. 23 de enero de 1998; 275(3): 413-8; Lauwereys *et al.*, EMBO J. 1 de julio de 1998; 17(13): 3512-20; Frenken *et al.*, Res Immunol. julio-agosto de 1998; 149(6):589-99; Transue *et al.*, Proteins 1 de septiembre de 1998; 32(4): 515-22; Muildermans y Lauwereys, J. Mol. Recognit. marzo-abril de 1999; 12 (2): 131-40; van der Linden *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 12 de abril de 1999; 1431(1): 37-46.; Decanniere *et al.*, Structure Fold. Des. 15 de abril de 1999; 7(4): 361-70; Ngyuen *et al.*, Mol. Immunol. junio de 1999; 36(8): 515-24; Woolven *et al.*, Immunogenetics octubre de 1999; 50 (1-2): 98-101; Riechmann y Muildermans, J. Immunol. Methods 10 de diciembre de 1999; 231 (1-2): 25-38; Spinelli *et al.*, Biochemistry 15 de febrero de 2000; 39(6): 1217-22; Frenken *et al.*, J. Biotechnol. 28 de febrero de 2000; 78(1): 11-21; Nguyen *et al.*, EMBO J. 1 de marzo de 2000; 19(5): 921-30; van der Linden *et al.*, J. Immunol. Methods 23 de junio de 2000; 240 (1-2): 185-95; Decanniere *et al.*, J. Mol. Biol. 30 de junio de 2000; 300 (1): 83-91; van der Linden *et al.*, J. Biotechnol. 14 de julio de 2000; 80(3): 261-70; Harmsen *et al.*, Mol. Immunol. agosto de 2000; 37(10): 579-90; Perez *et al.*, Biochemistry 9 de enero de 2001; 40(1): 74-83; Conrath *et al.*, J. Biol. Chem. 9 de marzo de 2001; 276 (10): 7346-50; Muildermans *et al.*, Trends Biochem Sci. abril de 2001; 26(4):230-5; Muildermans S., J. Biotechnol. junio de 2001; 74 (4): 277-302; Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 13 de julio de 2001; 276 (28): 26285-90; Spinelli *et al.*, J. Mol. Biol. 3 de agosto de 2001; 311 (1): 123-9; Conrath *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. octubre de 2001; 45 (10): 2807-12; Decanniere *et al.*, J. Mol. Biol. 26 de octubre de 2001; 313(3): 473-8; Nguyen *et al.*, Adv Immunol. 2001; 79: 261-96; Muruganandam *et al.*, FASEB J. febrero de 2002; 16 (2): 240-2; Ewert *et al.*, Biochemistry 19 de marzo de 2002; 41 (11): 3628-36; Dumoulin *et al.*, Protein Sci. marzo de 2002; 11 (3): 500-15; Cortez-Retamozo *et al.*, Int. J. Cancer. 20 de marzo de 2002; 98 (3): 456-62; Su *et al.*, Mol. Biol. Evol. marzo de 2002; 19 (3): 205-15; van der Vaart JM., Methods Mol Biol. 2002; 178: 359-66; Vranken *et al.*, Biochemistry 9 de julio de 2002; 41 (27): 8570-9; Nguyen *et al.*, Immunogenetics abril de 2002; 54 (1): 39-47; Renisio *et al.*, Proteins 1 de junio de 2002; 47 (4): 546-55; Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 28 de junio de 2002; 277 (26): 23645-50; Ledebouer *et al.*, J. Dairy Sci. junio de 2002; 85 (6): 1376-82; De Genst *et al.*, J. Biol. Chem. 16 de

agosto de 2002; 277 (33): 29897-907; Ferrat *et al.*, *Biochem. J.* 1 de septiembre de 2002; 366 (Pt 2): 415-22; Thomassen *et al.*, *Enzyme and Microbial Technol.* 2002; 30: 273-8; Harmsen *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* diciembre de 2002; 60 (4): 449-54; Jobling *et al.*, *Nat Biotechnol.* enero de 2003; 21 (1): 77-80; Conrath *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* febrero de 2003; 27 (2): 87-103; Pleschberger *et al.*, *Bioconjug. Chem.* marzo-abril de 2003; 14 (2): 440-8; Lah *et al.*, *J. Biol. Chem.* 18 de abril de 2003; 278 (16): 14101-11; Nguyen *et al.*, *Immunology.* mayo de 2003; 109 (1): 93-101; Joosten *et al.*, *Microb. Cell Fact.* 30 de enero de 2003; 2 (1): 1; Li *et al.*, *Proteins* 1 de julio de 2003; 52 (1): 47-50; Loris *et al.*, *Biol Chem.* 25 de julio de 2003; 278 (30): 28252-7; van Koningsbruggen *et al.*, *J. Immunol. Methods.* agosto de 2003; 279 (1-2): 149-61; Dumoulin *et al.*, *Nature.* 14 de agosto de 2003; 424 (6950): 783-8; Bond *et al.*, *J. Mol. Biol.* 19 de septiembre de 2003; 332 (3): 643-55; Yau *et al.*, *J. Immunol. Methods.* 1 de octubre de 2003; 281 (1-2): 161-75; Dekker *et al.*, *J. Virol.* noviembre de 2003; 77 (22): 12132-9; Meddeb-Mouelhi *et al.*, *Toxicon.* diciembre de 2003; 42 (7): 785-91; Verheesen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 5 de diciembre de 2003; 1624 (1-3): 21-8; Zhang *et al.*, *J Mol Biol.* 2 de enero de 2004; 335 (1): 49-56; Stijlemans *et al.*, *J Biol Chem.* 9 de enero de 2004; 279 (2): 1256-61; Cortez-Retamozo *et al.*, *Cancer Res.* 15 de abril de 2004; 64 (8): 2853-7; Spinelli *et al.*, *FEBS Lett.* 23 de abril de 2004; 564 (1-2): 35-40; Pleschberger *et al.*, *Bioconjug. Chem.* mayo-junio de 2004; 15 (3): 664-71; Nicaise *et al.*, *Protein Sci.* julio de 2004; 13 (7): 1882-91; Omidfar *et al.*, *Tumour Biol.* julio-agosto de 2004; 25 (4): 179-87; Omidfar *et al.*, *Tumour Biol.* septiembre-diciembre de 2004; 25(5-6): 296-305; Szynol *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2004; 48(9):3390-5; Saerens *et al.*, *J. Biol. Chem.* 10 de diciembre de 2004; 279 (50): 51965-72; De Genst *et al.*, *J. Biol. Chem.* 17 de diciembre de 2004; 279 (51): 53593-601; Dolk *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* enero de 2005; 71(1): 442-50; Joosten *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol.* enero de 2005; 66(4): 384-92; Dumoulin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 25 de febrero de 2005; 346 (3): 773-88; Yau *et al.*, *J Immunol Methods.* febrero de 2005; 297 (1-2): 213-24; De Genst *et al.*, *J. Biol. Chem.* 8 de abril de 2005; 280 (14): 14114-21; Huang *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* 13 de abril de 2005; Dolk *et al.*, *Proteins.* 15 de mayo de 2005; 59 (3): 555-64; Bond *et al.*, *J. Mol. Biol.* 6 de mayo de 2005; 348(3):699-709; Zarebski *et al.*, *J. Mol. Biol.* 21 de abril de 2005; [publicación electrónica antes de impresión].

Según la terminología usada en las referencias anteriores, los dominios variables presentes en anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural también se denominarán "dominios V<sub>HH</sub>", con el propósito de distinguirlos de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominará más adelante en el presente documento "dominios V<sub>H</sub>") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominarán más adelante en el presente documento "dominios V<sub>L</sub>").

Tal como se menciona en la técnica anterior mencionada anteriormente, los dominios V<sub>HH</sub> tienen varias características estructurales y propiedades funcionales únicas que hacen que los dominios V<sub>HH</sub> aislados (así como nanocuerpos basados en los mismos, que comparten estas características estructurales y propiedades funcionales con los dominios V<sub>HH</sub> que se producen de manera natural) y las proteínas que contienen los mismos sean altamente ventajosos para su uso como proteínas o dominios de unión a antígeno funcionales. En particular, y sin limitarse a lo mismo, los dominios V<sub>HH</sub> (que se han "diseñado" por la naturaleza para unirse funcionalmente a un antígeno sin la presencia de, y sin ninguna interacción con, un dominio variable de cadena ligera) y los nanocuerpos pueden funcionar como una unidad estructural, dominio o proteína de unión a antígeno, funcional, relativamente pequeño e individual. Esto distingue a los dominios V<sub>HH</sub> de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, que generalmente no son adecuados por sí solos para su aplicación práctica como proteínas o dominios de unión a antígeno individuales, sino que necesitan combinarse de alguna forma u otra para proporcionar una unidad de unión a antígeno funcional (como por ejemplo, en los fragmentos de anticuerpo convencionales tales como fragmentos Fab; en los fragmentos ScFv, que consisten en un dominio V<sub>H</sub> unido covalentemente a un dominio V<sub>L</sub>).

Debido a estas propiedades únicas, el uso de dominios V<sub>HH</sub> y nanocuerpos como proteínas de unión a antígeno individuales o como dominios de unión a antígeno (es decir, como parte de una proteína o polipéptido más grande) ofrece varias ventajas significativas con respecto al uso de dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> convencionales, scFv o fragmentos de anticuerpo convencionales (tales como fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>):

- solo se requiere un único dominio para unirse a un antígeno con alta afinidad y con alta selectividad, de modo que no existe la necesidad de tener dos dominios independientes presentes, ni de garantizar que estos dos dominios estén presentes en la conformación y configuración espacial correcta (es decir, a través del uso de ligadores especialmente diseñados, como con scFv);

- los dominios V<sub>HH</sub> y nanocuerpos se pueden expresar a partir de un único gen y no requieren plegado o modificaciones postraduccionales;

- los dominios V<sub>HH</sub> y nanocuerpos se pueden manipular genéticamente de forma sencilla para dar formatos multivalentes y multiespecíficos (tal como se describe adicionalmente en el presente documento);

- los dominios dominio V<sub>HH</sub> y nanocuerpos son altamente solubles y no tienen tendencia a agregarse (como con los dominios de unión a antígeno derivados de ratón descritos por Ward *et al*, *Nature*, vol. 341, 1989, pág. 544);

- los dominios V<sub>HH</sub> y nanocuerpos son altamente estables frente al calor, pH, proteasas y otros agentes o condiciones

desnaturalizantes (véase por ejemplo Ewert *et al.*, citado anteriormente);

- los dominios  $V_{HH}$  y nanocuerpos son sencillos y relativamente económicos de preparar, incluso a una escala requerida para la producción. Por ejemplo, pueden producirse dominios  $V_{HH}$ , nanocuerpos y proteínas/polipéptidos que contienen los mismos usando fermentación microbiana (por ejemplo, como se describe adicionalmente a continuación) y no requieren el uso de sistemas de expresión de mamíferos, como por ejemplo con fragmentos de anticuerpo convencionales;

- los dominios  $V_{HH}$  y nanocuerpos son relativamente pequeños (aproximadamente 15 kD, o 10 veces más pequeños que una IgG convencional) en comparación con anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y en consecuencia muestran penetración en tejidos alta (mayor) (incluyendo, pero sin limitarse a, tumores sólidos y otros tejidos densos) que tales anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos;

- los dominios  $V_{HH}$  y nanocuerpos pueden mostrar las denominadas propiedades de unión a la cavidad (debido entre otras cosas a su bucle de CDR3 extendido, en comparación con dominios  $V_H$  convencionales) y en consecuencia también pueden acceder a dianas y epítomos no accesibles para anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, se ha mostrado que los dominios  $V_{HH}$  y nanocuerpos pueden inhibir enzimas (véanse por ejemplo el documento WO 97/49805; Transue *et al.*, (1998), citado anteriormente; Lauwereys *et al.*, (1998), citado anteriormente).

Tal como se mencionó anteriormente, la invención se refiere de manera general a nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa, así como a polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más de tales nanocuerpos, que pueden usarse con propósitos profilácticos, terapéuticos y/o de diagnóstico descritos a continuación y en el documento WO 04/041862.

Como también se mencionó anteriormente y se describe adicionalmente a continuación, la invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican para tales nanocuerpos y polipéptidos, a métodos para preparar tales nanocuerpos y polipéptidos, a células huésped que expresan o son capaces de expresar tales nanocuerpos o polipéptidos, a usos de tales nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped, y a composiciones que comprenden tales nanocuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped.

Generalmente, debe observarse que el término nanocuerpo 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 nanocuerpos de la invención pueden obtenerse (1) aislando el dominio  $V_{HH}$  de un anticuerpo de cadena pesada que se produce de manera natural; (2) mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural; (3) mediante "humanización" (tal como se describe a continuación) de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para tal dominio  $V_{HH}$  humanizado; (4) mediante "camelización" (tal como se describe a continuación) de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de cualquier especie animal, en particular una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para tal dominio  $V_H$  camelizado; (5) mediante "camelización" de un "anticuerpo del dominio" o "Dab" tal como se describe por Ward *et al.* (citado anteriormente), o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica para tal dominio  $V_H$  camelizado; (6) usando técnicas de síntesis o semisíntesis para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos; (7) mediante la preparación de un ácido nucleico que codifica para un nanocuerpo usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos, seguido por la expresión del ácido nucleico así obtenido; y/o (8) mediante cualquier combinación de lo anterior. Los métodos y técnicas adecuados para realizar lo anterior serán evidentes para el experto basándose en la divulgación en el presente documento y, por ejemplo, incluyen los métodos y técnicas descritos con más detalle más adelante en el presente documento.

Sin embargo, según una realización específica, los nanocuerpos de la invención no tienen una secuencia de aminoácidos que sea exactamente igual que (es decir, como un grado de identidad de secuencia del 100% con) la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural, tal como la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de un mamífero, y en particular de un ser humano.

Una clase particularmente preferida de nanocuerpos de la invención comprende nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural, pero que se ha "humanizado", es decir, sustituyendo uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de  $V_{HH}$  que se produce de manera natural por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio  $V_H$  de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (por ejemplo, indicado anteriormente). Esto se puede realizar de una manera conocida en sí misma, que será evidente para el experto, por ejemplo basándose en la siguiente descripción adicional y la técnica anterior sobre humanización a la que se hace referencia en el presente documento. De nuevo, debe observarse que tales nanocuerpos humanizados de la invención pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida en sí misma (es decir, tal como se indica en los puntos (1) - (8) anteriores) y en consecuencia no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio  $V_{HH}$  que se

produce de manera natural como material de partida.

Una sustitución humanizante preferida, pero no limitativa, para nanocuerpos pertenecientes al grupo 103 P,R,S y/o al grupo GLEW (tal como se define en el presente documento) es 108Q a 108L.

Otra clase particularmente preferida de nanocuerpos de la invención comprende nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural que se ha "camelizado", es decir sustituyendo uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) de un dominio  $V_{HH}$  de un anticuerpo de cadena pesada. Esto se puede realizar de una manera conocida en sí misma, que será evidente para el experto, por ejemplo basándose en la siguiente descripción adicional. También se hace referencia al documento WO 94/04678. Tal camelización puede ocurrir con preferencia en posiciones de aminoácido que están presentes en la superficie de contacto  $V_H$ - $V_L$  y en los denominados residuos distintivos de *Camelidae* (véase también, por ejemplo, el documento WO 94/04678), como también se menciona a continuación. Preferentemente, el dominio o secuencia de  $V_H$  que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el nanocuerpo camelizado es preferentemente una secuencia de  $V_H$  de un mamífero, más preferentemente la secuencia de  $V_H$  de un ser humano. Sin embargo, debe observarse que tales nanocuerpos camelizados de la invención pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida en sí misma (es decir, indicada en los puntos (1) - (8) anteriores) y en consecuencia no están estrictamente limitado a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural como material de partida.

Por ejemplo, de nuevo como se describe adicionalmente a continuación, tanto la "humanización" como la "camelización" se pueden realizar proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica para tal dominio  $V_{HH}$  o dominio  $V_H$  que se producen de manera natural, respectivamente, y posteriormente cambiando, de una manera conocida en sí misma, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de modo que la nueva secuencia de nucleótidos codifica para un nanocuerpo humanizado o camelizado de la invención, respectivamente, y posteriormente expresando la secuencia de nucleótidos así obtenida de una manera conocida en sí misma de modo que se proporciona el nanocuerpo deseado de la invención. Alternativamente, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  o dominio  $V_H$  que se producen de manera natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, se puede diseñar y posteriormente sintetizar *de novo* usando técnicas para síntesis de péptidos conocidas en sí mismas. Asimismo, basándose en la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un dominio  $V_{HH}$  o dominio  $V_H$  que se producen de manera natural, respectivamente, una secuencia de nucleótidos que codifica para el nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, se puede diseñar y posteriormente sintetizar *de novo* usando técnicas para síntesis de ácido nucleico conocidas en sí mismas, después de lo cual la secuencia de nucleótidos así obtenida se puede expresar de una manera conocida en sí misma para proporcionar el nanocuerpo deseado de la invención.

Otras maneras y técnicas adecuadas para obtener los nanocuerpos de la invención y/o las secuencias de nucleótidos y/o ácidos nucleicos que codifican para los mismos, a partir de (la secuencia de aminoácidos de) dominios  $V_H$  que se producen de manera natural o preferentemente dominios  $V_{HH}$  y/o a partir de secuencias de nucleótidos y/o secuencias de ácido nucleico que codifican para los mismos serán evidentes para el experto, y por ejemplo, pueden comprender combinar una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos a partir de dominios  $V_H$  que se producen de manera natural (tales como una o más FR y/o CDR) con una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos a partir de dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural (tales como una o más FR o CDR), de una manera adecuada para proporcionar (una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica para) un nanocuerpo de la invención.

Nanocuerpo en su sentido más amplio se puede definir generalmente como un polipéptido que comprende:

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

y/o

b) una secuencia de aminoácidos que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas tres regiones/secuencias determinantes de la complementariedad, en la 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 R;

y/o

c) una secuencia de aminoácidos que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas tres regiones/secuencias determinantes de la complementariedad, en la 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 en particular se elige del grupo que

consiste en R y S.

En consecuencia, en un primer aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

5

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

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

10

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

y/o en el que:

15

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

y/o en el que:

20

iii) 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 en particular se elige del grupo que consiste en R y S;

y en el que

25

iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En particular, un nanocuerpo contra TNF-alfa según la invención puede tener la estructura:

30

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

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

35

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

y/o en el que:

40

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

y/o en el que:

45

iii) 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 en particular se elige del grupo que consiste en R y S;

y en el que

50

iv) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En particular, según un aspecto preferido pero no limitativo del aspecto de la invención, un nanocuerpo se puede definir generalmente como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que está compuesta por cuatro regiones/secuencias de entramado interrumpidas tres regiones/secuencias determinantes de la complementariedad, en el que;

55

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

60

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 preferentemente se elige del grupo que consiste en L o R; y

65

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 preferentemente es W o R, y lo más preferentemente es W;



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

o en el 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

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 preferentemente 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 preferentemente Q;

o en el que:

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

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 preferentemente se elige del grupo que consiste en L y R; y

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 en particular se elige 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 preferentemente Q.

En consecuencia, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

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

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

y en el que:

ii) 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 preferentemente se elige del grupo que consiste en L o R;

y en el que:

iii) 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 preferentemente W o R, y lo más preferentemente es W;

y en el que

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

y en el que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

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

i) 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 el que:

5

ii) el residuo de aminoácido en la posición 45 según la numeración de Kabat es R;

y en el que:

10 iii) 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 preferentemente W;

y en el que:

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

y en el que:

20 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

25

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

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

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

y en el que:

35 ii) 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 preferentemente se elige del grupo que consiste en L y R;

y en el que:

40 iii) 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 en particular se elige del grupo que consiste en R y S;

y en el que:

45 iv) el residuo de aminoácido en la posición 108 según la numeración de Kabat se elige del grupo que consiste en Q y L; es preferentemente Q;

y en el que:

50 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

55 Dos grupos particularmente preferidos, pero no limitativos, de los nanocuerpos de la invención son los que son según el punto a) anterior; según los puntos l) a a-4) anteriores; según el punto b) anterior; según los puntos b-1) a b-4) anteriores; según el punto c) anterior; y/o según los puntos c-1) a c-4) anteriores, en los que;

a) 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 más adelante) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

60

o en los que:

b) 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 preferentemente Q.

65

En consecuencia, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

5 en el que FR1 a FR4 se refieren a las regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en el que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en el 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 más adelante) y el residuo de aminoácido en la posición 108 es Q;

10 y en el que:

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

15

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

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

25

y en el que

ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

30

En los nanocuerpos de la invención 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 lo más preferentemente es F. En los nanocuerpos de la invención 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, V o F, y lo más preferentemente es F.

35

En consecuencia, sin limitarse a lo mismo de ninguna manera, basándose en los residuos de aminoácido presentes en las posiciones mencionadas anteriormente, los nanocuerpos de la invención se pueden clasificar generalmente basándose en los siguientes tres grupos:

40

a) El "grupo GLEW": nanocuerpos con la secuencia de aminoácidos GLEW en las posiciones 44-47 según la numeración de Kabat y Q en la posición 108 según la numeración de Kabat. Como se describe adicionalmente en el presente documento, los nanocuerpos de este grupo habitualmente tienen una V en la posición 37, y pueden tener un W, P, R o S en la posición 103, y preferentemente tienen un W en la posición 103. El grupo GLEW también comprende algunas secuencias tipo GLEW tales como las mencionadas en la siguiente tabla 2;

45

b) El "grupo KERE": nanocuerpos con la secuencia de aminoácidos KERE o KQRE o en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat y Q o L en la posición 108 según la numeración de Kabat. Como se describe adicionalmente en el presente documento, los nanocuerpos de este grupo habitualmente tienen un F en la posición 37, un L o F en la posición 47; y pueden tener un W, P, R o S en la posición 103, y preferentemente tienen un W en la posición 103;

50

c) El "grupo 103 P, R, S": nanocuerpos con un P, R o S en la posición 103. Estos nanocuerpos pueden tener o bien la secuencia de aminoácidos GLEW en las posiciones 44-47 de la numeración de Kabat o bien la secuencia de aminoácidos KERE o KQRE en las posiciones 43-46 según la numeración de Kabat, esta última lo más preferentemente 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 puede tener Q o L en la posición 108 según la numeración de Kabat, y preferentemente tener Q.

55

En consecuencia, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede ser un nanocuerpo perteneciente al grupo GLEW (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

60

65

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede ser un nanocuerpo perteneciente

al grupo KERE (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

5 En consecuencia, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede ser un nanocuerpo perteneciente al grupo 103 P, R, S (tal como se define en el presente documento), y en el que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

10 Asimismo, de forma más general y además de los residuos 108Q, 43E/44R y 103P,R,S mencionados anteriormente, los nanocuerpos de la invención pueden contener, en una o más posiciones que, en un dominio  $V_H$  convencional, formarán (parte de) la superficie de contacto  $V_H/V_L$ , uno más residuos de aminoácido que están más altamente cargados que los residuos de aminoácido que se producen de manera natural en la(s) misma(s) posición/posiciones en los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que se producen de manera natural correspondientes; y en particular uno o más residuos de aminoácido cargados (tal como se menciona en la tabla 1).

15 Tales sustituciones incluyen, pero no se limitan a, las secuencias tipo GLEW mencionadas en la siguiente tabla 2; así como las sustituciones que se describen en la solicitud internacional WO 00/29004 para los denominados "microcuerpos", por ejemplo una Q en la posición 108 y KLEW en las posiciones 44-47.

En algunas realizaciones de los nanocuerpos de la invención, el residuo de aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste en L, M, S, V y W; y es preferentemente L.

25 Asimismo, en algunas realizaciones de los nanocuerpos de la invención, el residuo de aminoácido en la posición 83 se elige del grupo que consiste en R, K, N, I y Q; y lo más preferentemente es K o E (para nanocuerpos correspondientes a dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural) o R (para nanocuerpos "humanizados", tal como se describen a continuación). El residuo de aminoácido en la posición 84 en algunas realizaciones se elige del grupo que consiste en P, A, R, S, D y V, y lo más preferentemente es P (para nanocuerpos correspondientes a dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural) o R (para nanocuerpos "humanizados", tal como se describen a continuación).

30 Además, en algunas realizaciones de los nanocuerpos de la invención, el residuo de aminoácido en la posición 104 se elige del grupo que consiste en G y D; y lo más preferentemente es G.

35 En conjunto, los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108, que en los nanocuerpos son tal como se mencionaron anteriormente, también se denominarán en el presente documento "residuos distintivos". Los residuos distintivos y los residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes del dominio  $V_H$  humano más estrechamente relacionado,  $V_{H3}$ , se resumen en la tabla 2.

40 Algunas combinaciones especialmente preferidas de estos residuos distintivos como aparecen en dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural se mencionan en la tabla 3. Para comparación, los residuos de aminoácido correspondientes del  $V_{H3}$  humano denominado DP-47 se han indicado en cursiva.

Tabla 2: residuos distintivos en nanocuerpos

45

Posición	$V_{H3}$ humano	Residuos distintivos
11	L, V; predominantemente L	L, M, S, V, W; preferentemente L
37	V, I, F; habitualmente V	F <sup>(1)</sup> , Y, H, I o V, preferentemente F <sup>(1)</sup> o Y
44 <sup>(8)</sup>	G	G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> , Q, R, S, L; preferentemente G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> o Q; lo más preferentemente G <sup>(2)</sup> o E <sup>(3)</sup>
45 <sup>(8)</sup>	L	L <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> , C, I, L, P, Q, V; preferentemente L <sup>(2)</sup> o R <sup>(3)</sup>
47 <sup>(8)</sup>	W, Y	W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> o F <sup>(1)</sup> , A, G, I, M, R, S o Y; preferentemente W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> , F <sup>(1)</sup> o R
83	R o K; habitualmente R	R, K <sup>(5)</sup> , N, E <sup>(5)</sup> , I, M o Q; preferentemente K o R; lo más preferentemente K
84	A, T, D; predominantemente A	P <sup>(5)</sup> , A, L, R, S, D, V; preferentemente P
103	W	W <sup>(4)</sup> , P <sup>(6)</sup> , R <sup>(6)</sup> , S; preferentemente W
104	G	G o D, preferentemente G
108	L, M o T; predominantemente L	Q, L <sup>(7)</sup> o R, preferentemente Q o L <sup>(7)</sup>

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.

5 (3): Habitualmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, por ejemplo como KEREL, KEREF, KQREL, KQREF o KEREG en las posiciones 43-47. Alternativamente, también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo, TEREL), KECE (por ejemplo, KECEL o KECER), RERE (por ejemplo, REREG), QERE (por ejemplo, QEREG), KGRE (por ejemplo, KGREG), KDRE (por ejemplo, KDREV). Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas, incluyen por ejemplo DECKL y NVCEL.

10 (4): Con GLEW en las posiciones 44-47 y KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

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

15 (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.

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

Tabla 3: Algunas combinaciones preferidas de residuos distintivos en nanocuerpos que se producen de manera natural.

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

	II	37	44	45	47	83	84	103	104	108
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 nanocuerpos, cada residuo de aminoácido en cualquier otra posición distinta de los residuos distintivos puede ser cualquier residuo de aminoácido que se produce de manera natural en la posición correspondiente (según la numeración de Kabat) de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural.

5 Tales residuos de aminoácido serán evidentes para el experto. Las tablas 4 - 7 mencionan algunos residuos no limitativos que pueden estar presentes en cada posición (según la numeración de Kabat) de las FR1, FR2, FR3 y FR4 de dominios  $V_{HH}$  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  $V_{HH}$  que se produce de manera natural (y que es el residuo de aminoácido más preferido para dicha posición en un nanocuerpo) está indicado 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 los dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural respalda la hipótesis subyacente de la numeración de Chothia (citada anteriormente) de que los residuos en estas posiciones ya forman parte de CDR1).

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

20 Tabla 4: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR1 (para las notas al pie, véanse las notas al pie de

la tabla 2)

Pos.	Residuo(s) de aminoácido:	
	V <sub>H</sub> 3 humano	V <sub>HH</sub> de camélido
1	E, Q	Q, A, E, D, H, R
2	V	V, A, E, G, L, M, Q
3	Q	Q, K, E, H, P, R, Y
4	L	L, F, P, R, V
5	V, L	Q, E, L, V, M, P, A, I
6	E	E, D, Q, A, H
7	S, T	S, F, H
8	G, R	G, A, R
9	G	G, E
10	G, V	G, D, R, A, E, N, T, V
11	Residuo distintivo: L, M, S, V, W, F, N, P, T, Y; preferentemente L	
12	V, I	V, A, G, M
13	Q, K, R	Q, E, K, D, G, A, H, L, N, P, R, T
14	P	A, Q, A, G, P, T, V, E, F, I, N, S
15	G	G
16	G, R	G, A, E, D, N, P, R, S, V, W
17	S	S, F, T, N, P, A, C
18	L	L, V, M, Q, R
19	R, K	R, K, L, N, S, T, A, F, G, I, M, Q
20	L	L, F, I, V, M, S
21	S	S, F, T, G, H, P, A
22	C	C
23	A, T	A, D, P, S, T, V, E, G, I, L, Q, R
24	A	A, I, S, T, V, C, E, F, G, L, N, P, Q, Y



25	<b>S</b>	S, A, F, P, T, L, V
26	<b>G</b>	G, D, E, R, S, V, A, I, M, P, T
27	<b>F</b>	S, F, R, L, P, G, N, A, D, E, H, I, K, M, Q, T, V, Y
28	<b>T</b>	N, T, E, D, S, I, R, A, G, R, F, Y, L, M, P, V
29	<b>F, V</b>	F, L, D, S, I, G, V, A, E, P, T, Y
30	<b>S, D, G</b>	N, S, E, G, A, D, M, T, H, I, P, R, V, W

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

<b>Pos.</b>	<b>Residuo(s) de aminoácido:</b>	
	V <sub>H</sub> 3 humano	V <sub>HH</sub> de camélido
36	<b>W</b>	<b>W</b>
37	Residuo distintivo: F <sup>(1)</sup> , Y, H, I, A, L, P, S o V; preferentemente F <sup>(1)</sup> o Y	
38	<b>R</b>	<b>R</b>
39	<b>Q</b>	<b>Q, H, P, R, A, D, G, L, E</b>
40	<b>A</b>	<b>A, F, G, P, T, V, I, L, N, R, S, Y</b>
41	<b>P, S, T</b>	<b>P, A, L, S, I, Q, T</b>
42	<b>G</b>	<b>G, E, D, R, T, V</b>
43	<b>K</b>	<b>K, D, E, N, Q, R, T, V, A, L, M, S</b>
44	Residuo distintivo: G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> , D, Q, R, S, L, A, F, K, M, N, P, V, W, Y; preferentemente G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> o Q; lo más preferentemente G <sup>(2)</sup> o E <sup>(3)</sup>	
45	Residuo distintivo: L <sup>(2)</sup> , R <sup>(3)</sup> , C, I, L, P, Q, V, D, E, G, H, K, T; preferentemente L <sup>(2)</sup> o R <sup>(3)</sup>	

46	<u>E</u> , V	E, D, K, Q, V, A, G, N
47	Residuo distintivo: W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> o F <sup>(1)</sup> , A, G, I, M, R, S, D, E, H, K, Q, T, V, o Y; preferentemente W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> , F <sup>(1)</sup> o R	
48	V	V, I, L, A, C, E, F, G, H, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
49	S, <u>A</u> , <u>G</u>	A, <u>S</u> , A, G, T, V, D, E, I, L, Q, R, Y

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

Pos.	Residuo(s) de aminoácido:	
	V <sub>H</sub> 3 humano	V <sub>HH</sub> de camélido
66	R	R
67	F	F, L, V, A, D, I, S, Y
68	T	T, A, S, D, F, G, I, K, N
69	I	I, M, V, A, F, L, R, S, T
70	S	S, A, F, <u>E</u> , G, K, P, T, V
71	R	R, G, I, K, Q, S, T, W, A, F, L, M, N
72	D, E	D, E, G, N, V, A, H, I, L, Q, S, T
73	N, <u>D</u> , G	N, D, F, I, K, S, T, Y, A, G, H, L, M, R, V
74	A, S	A, D, G, N, P, S, T, F, H, I, L, R, V, Y
75	K	K, A, E, K, L, N, Q, R, D, G, I, M, S, T, V, W
76	N, S	N, D, K, R, S, T, Y, E, G, H, I, Q
77	<u>S</u> , <u>T</u> , I	T, A, E, I, M, S, K, L, N, R, V
78	L, A	V, <u>L</u> , A, F, G, I, M, E, N, Q, R, S, T, W
79	Y, H	Y, A, D, F, H, S, T, C, E, I, L, N, V, W

80	L	L, F, V, M
81	Q	Q, E, R, T, G, H, I, K, L, M, N
82	M	M, I, L, V, G, P, T
82a	N, G	N, D, G, H, S, T, A, E, I, K, R, V
82b	S	S, <u>N</u> , D, G, R, A, C, E, F, I, K, M, P, T, V
82c	L	L, P, M, T, V
83	Residuo distintivo: R, K <sup>(5)</sup> , N, E <sup>(5)</sup> , I, M, A, D, G, L, Q, S, T o Q; preferentemente K o R; lo más preferentemente K	
84	Residuo distintivo: P <sup>(5)</sup> , A, L, R, S, D, V, F, G, H, N, T, Y; preferentemente P	
85	E, G	E, D, G, Q, A, N, R, V, Y
86	D	D, E, F, Y
87	T, M	T, S, A, C, M
88	A	A, <u>G</u> , S, D, L, N, P
89	V, L	V, A, D, I, L, M, N, R, T, E, F, S
90	Y	Y, F, E, H, N
91	Y, H	Y, D, F, H, L, S, T, V, C, I, N, R, W
92	C	C
93	A, K, T	A, <u>N</u> , G, H, K, R, S, T, V, Y, E, F, I, L, M, Q
94	K, R, T	A, <u>V</u> , C, F, G, I, L, R, S, D, E, K, M, N, P, Q, T, W, Y T o K;

Tabla 7: Ejemplos no limitativos de residuos de aminoácido en FR4 (para las notas al pie, véanse las notas al pie en

la tabla 2)

Pos.	Residuo(s) de aminoácido:	
	V <sub>H</sub> 3 humano	V <sub>HH</sub> de camélido
103	Residuo distintivo: W <sup>(4)</sup> , P <sup>(6)</sup> , R <sup>(6)</sup> , S, F, G, K, L, N, Q, V, Y; preferentemente W	
104	Residuo distintivo: G, A, R, S, T o D; preferentemente G	
105	<b>Q, R</b>	<b>Q, E, K, P, R, G, H, L, S, V</b>
106	<b>G</b>	<b>G</b>
107	<b>T</b>	<b>T, A, I, N, P</b>
108	Residuo distintivo: Q, L <sup>(7)</sup> , E, H, N, P, T o R; preferentemente Q o L <sup>(7)</sup>	
109	<b>V</b>	<b>V</b>
110	<b>T</b>	<b>T, I, A</b>
111	<b>V</b>	<b>V, A, I, G</b>
112	<b>S</b>	<b>S, F, A, L, P, T, Y</b>
113	<b>S</b>	<b>S, A, L, P, F, T</b>

5 En consecuencia, en otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

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

i) los residuos distintivos son tal como se definieron anteriormente;

y en el que:

15 ii) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

20 En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

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

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[1] QVQLQESGGG**X**VQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 1]

30 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en el que

35 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en el que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[36] WXRQAPGKXXEXVA [49]

[SEQ ID NO: 2]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido tal como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en el que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNKNTVYLQMNSLXXEDTSAVYYCAA [94]

[SEQ ID NO: 3]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en el que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[103] XXQGTXVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 4]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en el que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores;

en el que los residuos distintivos se indican con "X" y son tal como se definieron anteriormente en el presente documento y en los que los números entre corchetes se refieren a las posiciones de aminoácido según la numeración de Kabat.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

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

y en el que:

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26]

[SEQ ID NO: 5]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en la secuencia anterior;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en la secuencia anterior;

y en el que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencias de aminoácidos:

[36] WFRQAPGKERELVA [49] [SEQ ID NO: 6]

[36] WFRQAPGKEREFVA [49] [SEQ ID NO: 7]

[36] WFRQAPGKEREGA [49] [SEQ ID NO: 8]

[36] WFRQAPGKQRELVA [49] [SEQ ID NO: 9]

[36] WFRQAPGKQREFVA [49] [SEQ ID NO: 10]

[36] WYRQAPGKGLEWA [49] [SEQ ID NO: 11]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indica en cada de una de las secuencias anteriores;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en el que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 12]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con la secuencia de aminoácidos anterior; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es

preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

5 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

10 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

15 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

20 (3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en el que:

25 iv) FR4 se elige del grupo que consiste en la secuencias de aminoácidos:

[103] WGQGTQVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 13]

[103] WGQGTLVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 14]

30 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en el que

35 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

40 (3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

45 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

50 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácido, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

55 y en el que:

60 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura



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

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

y en el que

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26] [SEQ ID NO: 5]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácido anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en la secuencia anterior;

y en el que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencias de aminoácidos:

[36] WFRQAPGKERELVA [49] [SEQ ID NO: 6]

[36] WFRQAPGKEREFVA [49] [SEQ ID NO: 7]

[36] WFRQAPGKEREGA [49] [SEQ ID NO: 8]

[36] WFRQAPGKQRELVA [49] [SEQ ID NO: 9]

[36] WFRQAPGKQREFVA [49] [SEQ ID NO: 10]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en el que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[66] RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 12]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es

preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

5 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indica en cada una de secuencias anteriores;

y en el que:

10

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en la secuencias de aminoácidos:

[103] WGQGTQVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 13]

[103] WGQGTLVTVSS [113]

[SEQ ID NO: 14]

15 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

20 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 7; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

25 (3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en el que:

30 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

35

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

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

40

i) FR1 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

[1] QVQLQESGGLVQAGGSLRLS**CA**ASG [26]

[SEQ ID NO: 5]

45 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

50 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 4; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

55 (3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en la secuencia anterior;

y en el que:

ii) FR2 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

**[36] WYRQAPGKGLEWA [49]****[SEQ ID NO: 11]**

5 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

10 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

15 (3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en el que:

20 iii) FR3 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

**[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94] [SEQ ID NO: 12]**

25 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

30 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

35 (3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

y en el que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos:

**[103] WGQGTQVTVSS [113]****[SEQ ID NO: 13]**

40 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tiene 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

45 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente o una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 7; y/o

50 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es); y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indica en cada una de las secuencias anteriores;

55 y en el que:

v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

60

Algunas otras secuencias de entramado que pueden estar presentes en los nanocuerpos de la invención se pueden hallar en la patente europea EP 656 946 mencionada anteriormente (véase por ejemplo, también el documento estadounidense concedido equivalente 5.759.808).

5 En otro aspecto preferido, pero no limitativo, un nanocuerpo de la invención puede tener la estructura

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

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

i) FR1 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR1 presentes en los nanocuerpos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99, y en particular en los nanocuerpos humanizados de SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99,

15 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR1; en el que

20 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 4; y/o

25 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR1; y

(3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en dicha secuencia de FR1;

30 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR1, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 4; y/o

35 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR1; y

40 (3) el residuo distintivo en la posición es tal como se indica en dicha secuencia de FR1;

y en el que:

45 ii) FR2 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR2 presentes en los nanocuerpos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99, y en particular en los nanocuerpos humanizados de SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99,

50 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR2; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 5; y/o

55 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR2; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indica en dicha secuencia FR2;

60 y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencias de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR2, en el que:

65 (1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 5; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR2; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 son tal como se indican en dicha secuencia de FR2;

y en el que:

iii) FR3 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR3 presentes en los nanocuerpos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99, y en particular en los nanocuerpos humanizados de SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99,

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR3; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR3; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 tal como se indican en dicha secuencia de FR3;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tiene 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR3, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR3; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 83 y 84 son tal como se indica en dicha secuencia de FR3;

y en el que:

iv) FR4 se elige del grupo que consiste en las secuencias de FR4 presentes en los nanocuerpos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99, y en particular en los nanocuerpos humanizados de SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99,

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR4; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia de FR4; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 104 y 108 son tal como se indican dicha secuencia de FR4;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tiene 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de dichas secuencias de FR4, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido como se define en la tabla 6; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con dicha secuencia FR4; y

(3) los residuos distintivos en las posiciones 103, 304 y 108 son tal como se indica en dicha secuencia de FR4;

y en el que:

5 v) CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definieron anteriormente, y preferentemente son tal como se define según una de las definiciones preferidas anteriores, y más preferentemente son tal como se define según una de las definiciones más preferidas anteriores.

10 Algunos nanocuerpos particularmente preferidos de la invención se pueden elegir de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99, y en particular en los nanocuerpos humanizados de SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99; en el que

15 (1) los residuos distintivos pueden ser tal como se indica en la tabla 2 anterior;

(2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido tal como se define en las tablas 4-7; y/o

20 (3) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es).

25 Algunos nanocuerpos aún más particularmente preferidos de la invención se pueden elegir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99, y en particular de los nanocuerpos humanizados de SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99 o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99; en el que

(1) los residuos distintivos son tal como se indican en la secuencia pertinente elegida de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99;

35 (2) cualquier sustitución de aminoácido en cualquier posición diferente de una posición distintiva es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento) y/o una sustitución de aminoácido que se define en las tablas 4-7; y/o

40 (3) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia pertinente elegida de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99.

45 Algunos de los nanocuerpos más preferidos de la invención se pueden elegir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99, y en particular de los nanocuerpos humanizados de SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99.

50 Como será evidente a partir de lo anterior, el término nanocuerpos de la invención tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio también comprende mutantes, variantes, alelos, análogos y ortólogos naturales o sintéticos (denominados colectivamente a continuación en el presente documento "análogos") de los nanocuerpos mencionados en SEQ ID NO 52 a 60, SEQ ID NO 76 a 86 o SEQ ID NO 95 a 99.

55 Generalmente, tales análogos pueden comprender, por ejemplo, secuencias homólogas, porciones funcionales, o una porción funcional de una secuencia homóloga (como se define adicionalmente más adelante) de un nanocuerpo. Generalmente, en tales análogos, cada residuo de aminoácido (diferente del residuo distintivo) en cada una de las regiones de entramado se puede reemplazar por otro residuo de aminoácido, con la condición de que el grado total de identidad de secuencia de las regiones de entramado permanezca tal como se definió anteriormente. Sin embargo, preferentemente, en tales análogos:

60 - uno o más residuos de aminoácido en las secuencias de entramado anteriores se reemplazan por uno o más residuos de aminoácido que se producen de manera natural en la misma posición en un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural. Algunos ejemplos de tales sustituciones se mencionan en las tablas 4-7 anteriores;

y/o:

65 - uno o más residuos de aminoácido en las secuencias de entramado anteriores se reemplazan por uno o más residuos que se pueden considerar una sustitución de aminoácido "conservativa", tal como se describió anteriormente en el

presente documento;

y/o:

5 - uno o más residuos en las secuencias de entramado anteriores se reemplazan por uno o más residuos de aminoácido que se producen de manera natural en la misma posición en un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural de un ser humano. Esto generalmente se denomina "humanización" del  $V_{HH}$ /nanocuerpo que se produce de manera natural en general y de dicha posición en particular, y se comentará con más detalle a continuación en el presente documento;

10 y:

- posiciones para las que solo se menciona un residuo de aminoácido tanto para el dominio  $V_H$  y como para el dominio  $V_{HH}$  en las tablas 4 – 7 anteriores preferentemente no se reemplazan.

15 Asimismo, aunque generalmente se prefiere menos, en tales análogos, uno o más residuos de aminoácido se pueden delecionar de las regiones de entramado y/o insertar en las regiones de entramado (opcionalmente además de una o más sustituciones de aminoácidos tal como se mencionó anteriormente), con la condición de que el grado total de identidad de secuencia de las regiones de entramado permanezca tal como se definió anteriormente. Los residuos distintivos no se deben delecionar. Asimismo, lo más preferentemente, los residuos de aminoácido para los que solo se menciona un residuo de aminoácido tanto para el dominio  $V_H$  como para el dominio  $V_{HH}$  en las tablas 4 - 7 anteriores preferentemente no se delecionan.

25 Generalmente, tales análogos pueden obtenerse, por ejemplo, proporcionando un ácido nucleico que codifica para un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural, cambiando los codones para el uno o más residuos de aminoácido que van a humanizarse por los codones para el/los residuo(s) de aminoácido humano(s) correspondiente(s), expresando la secuencia de ácido nucleico/nucleótidos así obtenida en un huésped o sistema de expresión adecuado; y opcionalmente aislando y/o purificando el análogo así obtenido para proporcionar dicho análogo en forma esencialmente aislada (tal como se definió anteriormente en el presente documento). Generalmente esto se puede realizar mediante métodos y técnicas conocidos en sí mismos, que serán evidentes para el experto, por ejemplo a partir de manuales y referencias citados en el presente documento y/o a partir de la descripción adicional a continuación en el presente documento. Alternativamente, y por ejemplo, un ácido nucleico que codifica para un análogo se puede sintetizar de una manera conocida en sí misma (por ejemplo, usando un aparato automatizado para sintetizar secuencias de ácido nucleico con una secuencia de aminoácidos predefinida) y se puede expresar en un huésped o sistema de expresión adecuado, después de lo cual el análogo así obtenido opcionalmente se puede aislar y/o purificar para proporcionar dicho análogo en forma esencialmente aislada (tal como se definió anteriormente en el presente documento). Otro modo de proporcionar los análogos implica la síntesis química de la secuencia de aminoácidos pertinente usando técnicas para síntesis de péptidos conocidas en sí mismas, tal como las mencionadas más adelante en el presente documento.

40 Generalmente también será evidente para el experto que los nanocuerpos (incluyendo análogos de los mismos) también se pueden preparar a partir de secuencias de  $V_H$  humanas (es decir, secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos correspondientes), tales como por ejemplo secuencias de  $V_{H3}$  humanas tales como DP-47, DP-51, DP-54 o DP-29, cambiando uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicho dominio  $V_H$  humano, para proporcionar una secuencia de aminoácidos que tiene (a) un Q en la posición 108; y/o (b) E en la posición 44 y/o R en la posición 45, y preferentemente E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103, tal como se describió anteriormente. De nuevo, esto se puede realizar generalmente usando los diversos métodos y técnicas mencionados en el párrafo anterior, usando una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos para un dominio  $V_H$  humano como punto de partida.

50 El término nanocuerpos tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio también comprende partes o fragmentos de los nanocuerpos (incluyendo análogos) de la invención tal como se definió anteriormente, que de nuevo pueden ser tal como se describe adicionalmente más adelante.

55 Generalmente, las partes o fragmentos de los nanocuerpos y/o análogos tienen secuencias de aminoácidos en las que, en comparación con la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo o análogo de longitud completa correspondiente, se han delecionado y/o eliminado 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. También es posible combinar una o más de tales partes o fragmentos para proporcionar un nanocuerpo de la invención.

60 Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo que comprende una o más partes o fragmentos de un nanocuerpo y/o análogo de longitud completa debe tener un grado de identidad de secuencia de al menos el 50%, preferentemente al menos el 60%, más preferentemente al menos el 70%, tal como al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95%, con la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo de longitud completa correspondiente.

65 Asimismo, la secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo que comprende una o más partes o fragmentos de un

nanocuerpo y/o análogo de longitud completa es preferentemente tal que comprende al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, preferentemente al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, más preferentemente al menos 30 residuos de aminoácido contiguos, tal como al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, de la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo de longitud completa correspondiente.

5 Generalmente, tales partes o fragmentos de los nanocuerpos de la invención tendrán secuencias de aminoácidos en las que, en comparación con la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo de longitud completa correspondiente de la invención, se han deletado y/o eliminado 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, 10 o cualquier combinación de los mismos. También es posible combinar una o más de tales partes o fragmentos para proporcionar un nanocuerpo de la invención.

Según una realización preferida, un fragmento tal como se usa en el presente documento comprende al menos una de las CDR presentes en un nanocuerpo de tamaño completo de la invención, preferentemente al menos dos de las CDR presentes en un nanocuerpo de tamaño completo de la invención, más preferentemente al menos CDR2 y CDR3 presentes en un nanocuerpo de tamaño completo de la invención, tal como por ejemplo las tres CDR presentes en un nanocuerpo de tamaño completo de la invención.

Según otra realización particularmente preferida, pero no limitativa, tal parte o fragmento comprende al menos FR3, CDR3 y FR4 del nanocuerpo de longitud completa correspondiente de la invención, es decir tal como se describe por ejemplo en la solicitud internacional WO 03/050531 (Lasters *et al.*).

Preferentemente, tales partes o fragmentos deben ser de tal modo que todavía se puedan unir a, tener afinidad por y/o tener especificidad por TNF-alfa, es decir con una afinidad y/o una especificidad que es de al menos el 10%, preferentemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 70%, incluso más preferentemente al menos el 80%, tal como al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99% o más, de la afinidad y/o especificidad del nanocuerpo de tamaño completo correspondiente de la invención, por ejemplo, en un ensayo para determinar la unión del análogo a TNF, y en particular uno de los ensayos usados en los siguientes ejemplos.

30 A partir de la descripción anterior en el presente documento, será evidente que las secuencias de aminoácidos de los nanocuerpos usados en el presente documento difieren en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones de entramado de las secuencias de aminoácidos de dominios  $V_H$  que se producen de manera natural, tales como la secuencias de aminoácidos de dominios  $V_H$  que se producen de manera natural de anticuerpos de seres humanos. En particular, será evidente que las secuencias de aminoácidos de los nanocuerpos usados en el presente 35 documento difieren en al menos uno de los residuos distintivos de las secuencias de aminoácidos de dominios  $V_H$  que se producen de manera natural, tales como la secuencias de aminoácidos de dominios  $V_H$  que se producen de manera natural de anticuerpos de camélidos y/o seres humanos.

En consecuencia, según una realización específica, un nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una posición de aminoácido en una de las regiones de entramado de la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural. Según una realización más específica, pero no limitativa, de la invención, un nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno de los residuos distintivos de la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  que se produce de manera natural.

45 A partir de la descripción anterior en el presente documento, también será evidente que las secuencias de aminoácidos de algunos de los nanocuerpos de la invención, tales como los nanocuerpos humanizados de la invención, diferirán en al menos una posición de aminoácido en al menos una de las regiones de entramado (es decir, en la posición de un residuo distintivo o en otra posición) de las secuencias de aminoácidos de dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural. En consecuencia, según una realización específica, pero no limitativa, un nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una posición de aminoácido en una de las regiones de entramado de la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural. Según una 50 realización más específica, pero no limitativa, de la invención, un nanocuerpo de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno de los residuos distintivos de la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_{HH}$  que se produce de manera natural.

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

60 Los ejemplos de tales modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácido dentro de la secuencia de nanocuerpo que se pueden modificar de tal manera (es decir, en el esqueleto de la proteína pero preferentemente 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.

65 Por ejemplo, tal modificación puede implicar la introducción (por ejemplo, por unión covalente o de otra manera



adecuada) de uno o más grupos, residuos o restos funcionales en o sobre el nanocuerpo de la invención, y en particular de uno o más grupos, residuos o restos funcionales que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas al nanocuerpo de la invención. Un ejemplo de tales grupos funcionales quedará claro para el experto.

5 Por ejemplo, tal modificación puede comprender la introducción (por ejemplo, por 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 nanocuerpo de la invención, que reducen la inmunogenicidad y/o la toxicidad del nanocuerpo de la invención, que eliminan o atenúan cualquier efecto secundario no deseado del nanocuerpo de la invención, y/o que confieren otras propiedades ventajosas y/o reducen las propiedades no deseadas de los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención; 10 o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. Ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para introducirlos serán evidentes para el experto, y en general pueden comprender todos los grupos funcionales y técnicas mencionados en los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente en el presente documento así como los grupos funcionales y técnicas conocidos en sí mismos para la modificación de proteínas farmacéuticas, y en particular para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (incluyendo ScFv y anticuerpos de dominio único), para los cuales se hace referencia por ejemplo a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Tales grupos funcionales por ejemplo pueden unirse directamente (por ejemplo, de forma covalente) a un nanocuerpo de la invención, u opcionalmente por medio de un ligador o espaciador adecuado, como de nuevo será evidente para el experto.

20 Una de las técnicas más ampliamente usadas para aumentar la semivida y/o la reducción de la inmunogenicidad de proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como polietilenglicol (PEG) o derivados del mismo (tales como metoxipolietilenglicol o mPEG). Generalmente, se puede usar 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 (simple) y ScFv); se hace referencia por ejemplo a Chapman, Nat. Biotechnol, 54, 531-545 (2002); por Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), por Hans y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en el documento WO 04/060965. También están comercialmente disponibles varios reactivos para la pegilación de proteínas, por ejemplo, de Nektar Therapeutics, EE.UU.

30 Preferentemente, 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, con este propósito, puede unirse PEG a un residuo de cisteína que se produce de manera natural en un nanocuerpo de la invención, un nanocuerpo de la invención se puede modificar para introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG se puede fusionar al extremo N- y/o C-terminal de un nanocuerpo de la invención, todo ello usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas en sí mismas por el experto.

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

45 Con respecto a la pegilación, debe observarse que generalmente, la invención también abarca cualquier nanocuerpo de la invención y/o polipéptido de la invención que se ha pegilado en una o más posiciones de aminoácido, preferentemente de manera que dicha pegilación (1) aumenta la semivida *in vivo*; (2) reduce la inmunogenicidad; (3) proporciona una o más propiedades beneficiosas adicionales conocidas en sí mismas para la pegilación; (4) no afecta esencialmente a la afinidad del nanocuerpo y/o polipéptido por TNF-alfa (por ejemplo, no reduce dicha afinidad en más del 90%, preferentemente no en más del 50%, y más preferentemente no en más del 10%, determinado por un ensayo adecuado, tal como los descritos en los siguientes ejemplos); y/o (4) no afecta a ninguna de las otras propiedades deseadas de los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención. Los grupos PEG y métodos adecuados para unirlos, o bien de forma específica o bien de forma no específica, serán evidentes para el experto. Los kits y reactivos adecuados para tal pegilación pueden obtenerse, por ejemplo, de Nektar (CA, EE.UU.).

55 Otra modificación, habitualmente menos preferida, comprende glicosilación unida a N o unida a O, habitualmente como parte de la modificación cotraduccional y/o postraduccional, dependiendo de la célula huésped usada para expresar el nanocuerpo o polipéptido de la invención.

60 Aún otra modificación puede comprender la introducción de una o más etiquetas detectables u otros grupos o restos generadores de señal, dependiendo del uso previsto del nanocuerpo marcado con etiqueta. Las etiquetas y técnicas para unirlos, usarlos y detectarlos adecuados serán evidentes para el experto, e incluyen por ejemplo, pero no se limitan a, etiquetas fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina y metales fluorescentes tales como <sup>152</sup>Eu u otros metales de la serie de los lantánidos), etiquetas fosforescentes, etiquetas quimioluminiscentes o etiquetas bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radioisótopos (tales como <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>32</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>51</sup>Cr, <sup>36</sup>Cl, <sup>57</sup>Co, <sup>58</sup>Co, <sup>59</sup>Fe y <sup>75</sup>Se), metales, quelatos de metales o cationes metálicos (por ejemplo, cationes metálicos tales como <sup>99m</sup>Tc, <sup>123</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>131</sup>I, <sup>97</sup>Ru, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga y <sup>68</sup>Ga u otros metales o cationes metálicos que son particularmente adecuados para su uso en el diagnóstico y la obtención

de imágenes *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, tales como ( $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{52}\text{Cr}$  y  $^{56}\text{Fe}$ ), así como cromóforos y enzimas (tales como malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotina avidina peroxidasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa). Otras etiquetas adecuadas serán evidentes para el experto, e incluyen por ejemplo restos que se pueden detectar usando espectroscopia RMN o ESR.

Tales nanocuerpos y polipéptidos marcados con etiqueta de la invención pueden usarse, por ejemplo, en ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo inmunoensayos conocidos en sí mismos tales como ELISA, RIA, EIA y otros “ensayos de tipo sándwich”, etc.) así como con propósitos de diagnóstico y de obtención de imágenes *in vivo*, dependiendo de la elección de la etiqueta específica.

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 mencionados anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen por ejemplo, sin limitación, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

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. Tal grupo funcional puede usarse para unir el nanocuerpo de la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de unión, es decir, mediante la formación del par de unión. Por ejemplo, un nanocuerpo de la invención se puede conjugar a biotina, y unir a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado a avidina o estreptavidina. Por ejemplo, tal nanocuerpo conjugado puede usarse como indicador, por ejemplo en un sistema diagnóstico en el que un agente que produce una señal detectable se conjuga a avidina o estreptavidina. Tales pares de unión también pueden usarse, por ejemplo, para unir el nanocuerpo de la invención a un portador, incluyendo portadores adecuados con propósitos farmacéuticos. Un ejemplo no limitativo son las formulaciones de liposomas 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 nanocuerpo de la invención.

En algunas aplicaciones, en particular para las aplicaciones en las que se pretende destruir una célula que expresa la diana contra la que se dirigen los nanocuerpos de la invención (por ejemplo, en el tratamiento del cáncer), o reducir o ralentizar el crecimiento y/o proliferación de tal célula, los nanocuerpos de la invención también pueden unirse a una toxina o a un residuo o resto tóxico. Los ejemplos de restos, compuestos o residuos tóxicos que pueden unirse a un nanocuerpo de la invención para proporcionar, por ejemplo, un compuesto citotóxico serán evidentes para el experto y se pueden hallar, por ejemplo, en la técnica anterior citada anteriormente y/o en la descripción adicional en el presente documento. Un ejemplo es la denominada tecnología ADEPT<sup>TM</sup> del documento WO 03/055527.

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

Tal como se mencionó anteriormente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que comprenden al menos un dominio  $V_{\text{HH}}$  (es decir, como se identifica usando los métodos de la invención) o al menos un nanocuerpo basado en los mismos.

Por “consiste esencialmente en” se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención o bien es exactamente la misma que la secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo (tal como se mencionó anteriormente) o bien corresponde a la secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo en el que se ha añadido un número limitado de residuos de aminoácido, tal como 1-10 residuos de aminoácido y preferentemente 1-6 residuos de aminoácido, tal como 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácido, al extremo amino terminal, al extremo carboxilo terminal, o tanto al extremo amino terminal como al extremo carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo.

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

a) pueden comprender un residuo Met N-terminal, por ejemplo como resultado de la expresión en una célula huésped u organismo huésped heterólogo;

b) pueden formar una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción del nanocuerpo desde una célula huésped después de la síntesis. Péptidos líder secretorios adecuados serán evidentes para el experto, y pueden ser tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Habitualmente, tal secuencia líder se unirá al extremo N-terminal del nanocuerpo, aunque la invención en su sentido más amplio no se limita a lo mismo;

c) puede formar una secuencia o señal que permite dirigir el nanocuerpo hacia y/o penetrar o entrar en órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos de células específicos y/o que permite que el nanocuerpo penetre o atraviese una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células

epiteliales, un tumor incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Ejemplos de tales secuencias de aminoácidos serán evidentes para el experto. Algunos ejemplos no limitativos son los vectores de péptido pequeño (“vectores Pep-trans”) descritos en el documento WO 03/026700 y en Tamsamani *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 1, 773 (2001); Tamsamani y Vidal, Drug Discov. Today, 9, 1012 (004) y Rousselle, J. Pharmacol. Exp. Ther., 296, 124-131 (2001), y la secuencia translocadora de membrana descrita por Zhao *et al.*, Apoptosis, 8, 631-637 (2003). Se describen secuencias de aminoácidos C-terminales y N-terminales para el direccionamiento intracelular de fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, en Cardinale *et al.*, Methods, 34, 171 (2004). Otras técnicas adecuadas para el direccionamiento intracelular implican la expresión y/o el uso de los denominados “intracuerpos” que comprenden un nanocuerpo de la invención, como se menciona a continuación;

d) puede formar una “etiqueta”, por ejemplo una secuencia de aminoácidos o residuo que permite o facilita la purificación del nanocuerpo, por ejemplo, mediante técnicas de afinidad dirigidas contra dicha secuencia o residuo. Después de eso, dicha secuencia o residuo se puede retirar (por ejemplo, por escisión química o enzimática) para proporcionar la secuencia de nanocuerpo (para este propósito, la etiqueta puede unirse opcionalmente a la secuencia de nanocuerpo por medio de una secuencia de ligador escindible o contener un motivo escindible). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales residuos son múltiples residuos de histidina, residuos de glutatión y una etiqueta myc tal como AAAEQKLISEEDLNGAA [SEQ ID NO: 31];

e) puede ser uno o más residuos de aminoácido que se han funcionalizado y/o que pueden servir como sitio para la unión de grupos funcionales. Residuos de aminoácido y grupos funcionales adecuados serán evidente 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 nanocuerpos de la invención.

Según otra realización, un polipéptido de la invención comprende un nanocuerpo de la invención, que se fusiona en su extremo amino terminal, en su extremo carboxilo terminal, o tanto en su extremo amino terminal como en su extremo carboxilo terminal a al menos una secuencia de aminoácidos adicional, es decir para proporcionar una proteína de fusión que comprende dicho nanocuerpo de la invención y la una o más secuencias de aminoácidos adicionales. Tal fusión también se denominará en el presente documento “fusión de nanocuerpo”.

La una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos adecuada y/o deseada. Las secuencias de aminoácidos adicionales pueden o no cambiar, alterar o influir de otro en las propiedades (biológicas) del nanocuerpo, y pueden o no añadir funcionalidad adicional al nanocuerpo o polipéptido de la invención. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos adicional es tal que confiere una o más propiedades o funcionalidades deseadas al nanocuerpo o polipéptido de la invención.

Los ejemplos de tales secuencias de aminoácidos serán evidentes para el experto, y generalmente pueden comprender todas las secuencias de aminoácidos que se usan en fusiones peptídicas basadas en anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos (incluyendo, pero sin limitarse a, ScFv y anticuerpos de dominio único). Se hace referencia por ejemplo a la revisión de Holliger y Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005).

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de este tipo puede ser una secuencia de aminoácidos que aumenta la semivida, la solubilidad o la absorción, reduce la inmunogenicidad o la toxicidad, elimina o atenúa efectos secundarios no deseados y/o confiere otras propiedades ventajosas y/o reduce las propiedades no deseadas de los polipéptidos de la invención, en comparación con el nanocuerpo de la invención en sí mismo. Algunos ejemplos no limitativos de tales secuencias de aminoácidos son las proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana (véase por ejemplo el documento WO 00/27435) o moléculas hapténicas (por ejemplo, haptenos que se reconocen por anticuerpos circulantes, véase por ejemplo el documento WO 98/22141).

Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden proporcionar un segundo sitio de unión, tal sitio de unión puede estar dirigido contra cualquiera proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítipo deseado (incluyendo, pero sin limitarse a, la misma proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítipo contra el cual se dirige el nanocuerpo de la invención, o una proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítipo diferente). Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos adicionales pueden proporcionar un segundo sitio de unión que se dirige contra una proteína sérica (tal como, por ejemplo, albúmina sérica humana u otra proteína sérica tal como IgG), para proporcionar un aumento de la semivida en suero. Se hace referencia por ejemplo a los documentos EP 0 368 684, WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 04/003019 (en los que se mencionan varias proteínas séricas), la solicitud internacional del solicitante titulada “Nanobodies™ against amyloid-beta and polypeptides comprising the same for the treatment of degenerative neural diseases such as Alzheimer’s disease” (en la que se mencionan varias otras proteínas), así como a Hamsen *et al.*, Vaccine, 23 (41); 4926-42.

Según otra realización, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden comprender una o más partes, fragmentos o dominios de los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (y en particular anticuerpos humanos) y/o de anticuerpos de cadena pesada. Por ejemplo, aunque habitualmente se prefiere menos, un nanocuerpo de la invención puede unirse a un dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> convencional (preferentemente humano) o a un análogo natural o sintético de un dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>, de nuevo opcionalmente por medio de una secuencia de ligador (incluyendo, pero sin limitarse a, otros anticuerpos de dominio (simple), tales como los dAb descritos por Ward *et al.*).

El al menos un nanocuerpo también puede unirse a uno o más dominios CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y/o CH<sub>3</sub> (preferentemente humanos) opcionalmente por medio de una secuencia de ligador. Por ejemplo, un nanocuerpo unido a un dominio CH<sub>1</sub> adecuado puede usarse, por ejemplo, junto con cadenas ligeras adecuadas, para generar fragmentos/estructuras de anticuerpos análogos a los fragmentos Fab o fragmentos F(ab')<sub>2</sub> convencionales, pero en los que uno o (en el caso de un fragmento de F(ab')<sub>2</sub>) uno o ambos de los dominios V<sub>H</sub> convencionales se han reemplazado por un nanocuerpo de la invención. Asimismo, dos nanocuerpos se pueden unir a un dominio CH<sub>3</sub> (opcionalmente por medio de un ligador) para proporcionar un constructo con aumento de la semivida *in vivo*.

Según una realización específica de un polipéptido de la invención, uno o más nanocuerpos de la invención pueden unirse a una o más partes, fragmentos o dominios de anticuerpo que confieren una o más funciones efectoras al polipéptido de la invención y/o pueden conferir la capacidad de unirse a uno o más receptores de Fc. Por ejemplo, con este propósito, y sin limitarse a lo mismo, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o más dominios CH<sub>2</sub> y/o CH<sub>3</sub> de un anticuerpo, tal como de un anticuerpo de cadena pesada (tal como se describe en el presente documento) y más preferentemente de un anticuerpo de 4 cadenas humano convencional; y/o puede formar (parte de) y la región Fc, por ejemplo de IgG, de IgE o de otra Ig humana. Por ejemplo, el documento WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprenden un dominio V<sub>HH</sub> de camélido o un derivado humanizado del mismo (es decir, un nanocuerpo), en los que el dominio CH<sub>2</sub> y/o CH<sub>3</sub> de *Camelidae* se ha reemplazado por dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> humanos, para proporcionar una inmunoglobulina que consiste en 2 cadenas pesadas que comprenden cada una un nanocuerpo y dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> humanos (pero no el dominio CH<sub>1</sub>), inmunoglobulina que tiene la función efectora proporcionada por los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> e inmunoglobulina que puede funcionar sin la presencia de ninguna cadena ligera. Otras secuencias de aminoácidos que pueden unirse de modo adecuado a los nanocuerpos de la invención para proporcionar una función efectora serán evidentes para el experto, y se pueden elegir basándose en la(s) función/funciones efectora(s) deseada(s). Se hace referencia por ejemplo a los documentos WO 04/058820, WO 99/42077 y WO 05/017148, así como a la revisión de Holliger y Hudson, citada anteriormente. El acoplamiento de un nanocuerpo de la invención a una porción de Fc también puede llevar a un aumento de la semivida, en comparación con el nanocuerpo correspondiente de la invención. Para algunas aplicaciones, el uso de una porción de Fc y/o de dominios constantes (es decir, dominios CH<sub>2</sub> y/o CH<sub>3</sub>) que confieren aumento de la semivida sin ninguna función efectora biológicamente significativa también puede ser adecuado o incluso preferido. Otros constructos adecuados que comprenden uno o más nanocuerpos y uno o más dominios constantes con aumento de la semivida *in vivo* serán evidentes para el experto, y por ejemplo pueden comprender dos nanocuerpos unidos a un dominio CH<sub>3</sub>, opcionalmente por medio de una secuencia de ligador. Generalmente, cualquier proteína de fusión o derivados con aumento de la semivida tendrá preferentemente un peso molecular de más de 50 kD, el valor límite para la absorción renal.

Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden formar una secuencia señal o secuencia líder que dirige la secreción del nanocuerpo o el polipéptido de la invención desde una célula huésped después de la síntesis (por ejemplo, para proporcionar una forma pre, pro o prepro del polipéptido de la invención, dependiendo de la célula huésped usada para expresar el polipéptido de la invención).

Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden formar una secuencia o señal que permite que el nanocuerpo o polipéptido de la invención se dirija hacia y/o penetre o entre en órganos, tejidos, células o partes o compartimientos de células específicos y/o que permite que el nanocuerpo o polipéptido de la invención penetre o atraviese una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células epiteliales, un tumor incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Ejemplos adecuados de tales secuencias de aminoácidos serán evidentes para el experto e incluyen por ejemplo, pero no se limitan a, los vectores "Peptrans" mencionados anteriormente, las secuencias descritas por Cardinale *et al.* y la secuencias de aminoácidos y fragmentos de anticuerpo conocidos en sí mismos que pueden usarse para expresar o producir los nanocuerpos y polipéptidos de la invención como los denominados "intracuerpos", por ejemplo tal como se describe en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618, US-A-7004940, WO 03/014960, WO 99/07414; WO 05/01690; EP 1 512 696; y en Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170, y las referencias adicionales descritas en los mismos.

Para algunas aplicaciones, en particular para las aplicaciones en las que se pretende destruir una célula que expresa la diana contra la que se dirigen los nanocuerpos de la invención (por ejemplo, en el tratamiento del cáncer), o reducir o ralentizar el crecimiento y/o proliferación de tal célula, los nanocuerpos de la invención también pueden unirse a una proteína o polipéptido (cito)tóxico. Ejemplos de tales proteínas y polipéptidos tóxicos que se pueden unir a un nanocuerpo de la invención para proporcionar, por ejemplo, un polipéptido citotóxico de la invención serán evidentes para el experto y se pueden hallar, por ejemplo, en la técnica anterior citada anteriormente y/o en la descripción adicional en el presente documento. Un ejemplo es la denominada tecnología ADEPT<sup>TM</sup> del documento WO 03/055527.

Según una realización no limitativa, uno o más residuos de aminoácido se pueden añadir a, insertar en y/o sustituir en la secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácido específicos para la unión de un grupo PEG.

La eficacia de productos farmacéuticos de proteína depende de su potencia para neutralizar la diana pero también de la farmacocinética intrínseca del fármaco potencial. Debido a que el riñón generalmente filtra moléculas de menos de 60.000 Dalton (Da), esfuerzos para reducir el aclaramiento se han centrado en aumentar el peso molecular del producto biofarmacéutico mediante fusiones de proteínas (Syed *et al.*, 1997), glicosilaciones o modificación con polímeros de polietilenglicol, es decir, pegilación (Lee *et al.*, 1999; Abuchowski *et al.*, 1977; Nucci *et al.*, 1991; Lecolley, *et al.* Chem Commun, 2004; Tao *et al.*, J Am Chem Soc, 2004; Mantovani *et al.*, 2005). Estos métodos prolongan satisfactoriamente la exposición *in vivo* del producto biofarmacéutico.

Alternativamente, la semivida se puede prolongar por medio de otro agente de pegilación, POLY PEG para la conjugación a los nanocuerpos bivalentes, TNF56 o TNF55. POLY PEG son polímeros con forma de peine con dientes de PEG sobre un esqueleto metacrílico. Los POLY PEG pueden variar con respecto a la longitud de la cadena de PEG, el esqueleto metacrílico y el grupo terminal activo que determina el método de conjugación del POLY PEG en el nanocuerpo. La conjugación específica del sitio en la cisteína C-terminal presente en los nanocuerpos puede obtenerse a través del grupo terminal maleimida activo en el POLY PEG.

La invención también abarca cualquier nanocuerpo de la invención y/o polipéptido de la invención que se ha glicosilado en una o más posiciones de aminoácido, habitualmente dependiendo del huésped usado para expresar el nanocuerpo o polipéptido de la invención (como se describe adicionalmente a continuación).

Según una realización no limitativa, uno o más residuos de aminoácido se pueden añadir a, insertar en y/o sustituir en la secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo o polipéptido de la invención, para proporcionar uno o más residuos de aminoácido específicos y/o un sitio que puede ser glicosilado por el organismo huésped usado. Por medio de un ejemplo preferido, pero no limitativo, el residuo N en la posición 50 dentro de CDR2 de un nanocuerpo de la invención por ejemplo se puede reemplazar por un residuo Q, D o S para proporcionar un sitio de glicosilación, por ejemplo, para la glicosilación por *Pichia*.

Según otra realización, un polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo, que se fusiona en su extremo amino terminal, en su extremo carboxilo terminal o tanto en su extremo amino terminal y como su extremo carboxilo terminal con al menos una secuencia de aminoácidos adicional.

De nuevo, dicha(s) secuencia(s) de aminoácidos adicional(es) puede(n) o no cambiar, alterar o influir de otro en las propiedades (biológicas) del nanocuerpo, y puede(n) o no añadir funcionalidad adicional al nanocuerpo.

Por ejemplo, según una realización preferida, pero no limitativa, dicha secuencia de aminoácidos adicional puede comprender al menos un nanocuerpo adicional, para proporcionar un polipéptido de la invención que comprende al menos dos, tal como tres, cuatro o cinco nanocuerpos, en la que dichos nanocuerpos pueden estar opcionalmente unidos por medio de una o más secuencias de ligador (tal como se define en el presente documento).

Los polipéptidos de la invención que comprenden dos o más nanocuerpos también se denominarán en el presente documento polipéptidos "multivalentes". Por ejemplo un polipéptido "bivalente" de la invención comprende dos nanocuerpos, opcionalmente unidos por medio de una secuencia de ligador, mientras que un polipéptido "trivalente" de la invención comprende tres nanocuerpos, opcionalmente unidos por medio de dos secuencias de ligador; etc.

En un polipéptido multivalente de la invención, los dos o más nanocuerpos pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, los dos o más nanocuerpos en un polipéptido multivalente de la invención:

- se pueden dirigir contra el mismo antígeno, es decir contra las mismas partes o epítomos de dicho antígeno o contra dos o más partes o epítomos diferentes de dicho antígeno; y/o:

- se pueden dirigir contra antígenos diferentes;

o una combinación de los mismos.

En consecuencia, un polipéptido bivalente de la invención por ejemplo:

- puede comprender dos nanocuerpos idénticos;

- puede comprender un primer nanocuerpo dirigido contra una primera parte o epítomo de un antígeno y un segundo nanocuerpo dirigido contra la misma parte o epítomo de dicho antígeno o contra otra parte o epítomo de dicho antígeno;

- o puede comprender un primer nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y un segundo nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno;

mientras que un polipéptido trivalente de la invención por ejemplo:

- puede comprender tres nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos contra partes o epítomos iguales o diferentes del

mismo antígeno;

- puede comprender dos nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos contra partes o epítomos iguales o diferentes en un primer antígeno y un tercer nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno; o

- puede comprender un primer nanocuerpo dirigido contra a primer antígeno, un segundo nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno, y un tercer nanocuerpo dirigido contra un tercer antígeno diferente de dichos antígenos primero y segundo.

Los polipéptidos de la invención que contienen al menos dos nanocuerpos, en los que al menos un nanocuerpo se dirige contra un primer antígeno y al menos un nanocuerpo se dirige contra un segundo antígeno diferente del primer antígeno, también se denominarán nanocuerpos "multiespecíficos". En consecuencia, un nanocuerpo "biespecífico" es un nanocuerpo que comprende al menos un nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y al menos un nanocuerpo adicional dirigido contra un segundo antígeno, mientras que un nanocuerpo "triespecífico" es un nanocuerpo que comprende al menos un nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno, al menos un nanocuerpo adicional dirigido contra un segundo antígeno, y al menos un nanocuerpo adicional dirigido contra un tercer antígeno; etc.

Por consiguiente, en su forma más simple, un polipéptido biespecífico de la invención es un polipéptido bivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende un primer nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno y un segundo nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno, en el que dichos nanocuerpos primero y segundo pueden estar opcionalmente unidos por medio de una secuencia de ligador (tal como se define en el presente documento); mientras que un polipéptido triespecífico de la invención en su forma más simple es un polipéptido trivalente de la invención (tal como se define en el presente documento), que comprende un primer nanocuerpo dirigido contra un primer antígeno, un segundo nanocuerpo dirigido contra un segundo antígeno y un tercer nanocuerpo dirigido contra un tercer antígeno, en el que dichos nanocuerpos primero, segundo y tercero pueden estar opcionalmente unidos por medio de una o más, y en particular una y más en particular dos, secuencias de ligador.

Sin embargo, como será evidente a partir de la descripción anterior en el presente documento, la invención no se limita a lo mismo, en el sentido de que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender cualquier número de nanocuerpos dirigidos contra dos o más antígenos diferentes.

Para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios  $V_{HH}$  y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 276, 10, 7346-7350, así como al documento EP 0 822 985.

En los polipéptidos de la invención, el uno o más nanocuerpos y el uno o más polipéptidos pueden unirse directamente entre sí (tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/23221) y/o pueden unirse entre sí por medio de uno o más espaciadores o ligadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos.

Los espaciadores o ligadores adecuados para su uso en los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos serán evidentes para el experto, y generalmente pueden ser cualquier ligador o espaciador usado en la técnica para unir secuencias de aminoácidos. Preferentemente, dicho ligador o espaciador es adecuado para su uso en la construcción de proteínas o polipéptidos que están destinados para el uso farmacéutico.

Algunos espaciadores particularmente preferidos incluyen los espaciadores y ligadores que se usan en la técnica para unir fragmentos de anticuerpo o dominios de anticuerpo. Estos incluyen los ligadores mencionados en la antecedentes generales de la técnica citados anteriormente, así como por ejemplo los ligadores que se usan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos ScFv (sin embargo, en este aspecto debe observarse que, mientras que en los diacuerpos y en los fragmentos ScFv, la secuencia de ligador usada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permiten que los dominios de  $V_H$  y  $V_L$  pertinentes se unan para formar el sitio de unión a antígeno completo, no existe limitación particular sobre la longitud o la flexibilidad del ligador usado en el polipéptido de la invención, ya que cada nanocuerpo por sí mismo forma un sitio de unión a antígeno completo).

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

También está dentro del alcance de la invención que el/los ligador(es) usado(s) confiera(n) una o más de otras propiedades favorables o funcionalidad a los polipéptidos de la invención, y/o proporcione(n) uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la unión de grupos funcionales (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento para los derivados de los nanocuerpos de la invención). Por ejemplo, ligadores que contienen uno o más residuos de aminoácido cargados (véase la tabla A-3 anterior) pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que ligadores que forman o contienen epítomos o etiquetas pequeñas pueden usarse con propósitos de detección, identificación y/o purificación. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto podrá determinar los ligadores óptimos para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente

después de algunos experimentos de rutina limitados.

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

Los ligadores para su uso en polipéptidos multivalentes y multispecíficos serán evidentes para el experto, y por ejemplo incluyen ligadores gly-ser, por ejemplo del tipo  $(gly_x, ser_y)_z$ , tales como, por ejemplo,  $(gly_4 ser)_3$  o  $(gly_3 ser_2)_3$ , tal como se describe en el documento WO 99/42077, regiones de tipo bisagra tales como las regiones bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural o secuencias similares. Para otros ligadores adecuados, también se hace referencia a los antecedentes generales de la técnica citados anteriormente. Algunos ligadores particularmente preferidos se facilitan en las SEQ ID NO 68 y 69.

Los ligadores también pueden proporcionar alguna funcionalidad al polipéptido multivalente o multispecífico. Por ejemplo, ligadores que contienen uno o más residuos de aminoácido cargados (véase la tabla 1 anterior) pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que ligadores que forman o contienen epítomos o etiquetas pequeñas pueden usarse con propósitos de detección, identificación y/o purificación.

Tal como se menciona en el presente documento, en una proteína o polipéptido de la invención, los nanocuerpos anti-TNF mencionados en el presente documento se unen preferentemente de tal modo que dicha proteína o polipéptido, después de la unión a un trímero de TNF, es capaz de inhibir o reducir la reticulación del receptor de TNF que está mediada por dicho trímero de TNF y/o la transducción de señal que está mediada por dicha reticulación del receptor; y/o de tal modo que la proteína o polipéptido es capaz de unirse de manera intramolecular a al menos dos sitios de unión al receptor de TNF en un trímero de TNF. Ligadores adecuados son tal como se describen en el presente documento.

Como también se menciona en el presente documento, se puede evaluar si una proteína o polipéptido proporciona unión intermolecular o unión extramolecular (al menos inicialmente) mediante una cromatografía de exclusión molecular. Mediante cromatografía de exclusión molecular se pueden analizar los complejos de TNF-alfa y anticuerpos para determinar el número y la razón de moléculas de anticuerpo y TNF-alfa en el complejo. A partir de estos datos se puede deducir si se produce unión inter o intramolecular, tal como se realizó por Santora y colaboradores (Santora, L.C., *et al*, Anal Biochem. 2001) para establecer la estequiometría de la unión del anticuerpo monoclonal D2E7 (Humira) a TNF-alfa a diferentes razones de anticuerpo y diana. A partir del peso molecular del complejo se concluyó que tres moléculas de anticuerpo se complejaban con tres trímeros de TNF, indicando de este modo que el anticuerpo se une en un modo intermolecular. Se realizaron experimentos similares con nanocuerpos bivalentes, en los que un ligador muy corto indujo la formación de complejos moleculares grandes, que se obtuvieron mediante enlaces intermoleculares. Sin embargo, los mismos constructos de nanocuerpos bivalentes con ligadores más largos eluyeron de la columna de filtración en gel como complejos pequeños diferenciados, demostrando de este modo que se formaron enlaces intramoleculares. En combinación con los datos del bioensayo, en el que el ligador más largo que contiene el nanocuerpo TNF1 tenía una potencia óptima (neutralización completa de la cantidad de TNF usado en el ensayo, es decir 10 pM), se puede concluir que la unión intramolecular del nanocuerpo bivalente impide de modo eficiente la reticulación de dos receptores unidos a células y la activación del receptor asociado. Anticuerpos monoclonales conocidos tales como Humira o Remicade no pueden formar tales enlaces intramoleculares, dejando siempre dos sitios de unión al receptor en la molécula de TNF trimérica disponibles hasta cierto grado para la interacción con el receptor unido a la célula, lo cual se traduce en una neutralización menos potente según se mide en el bioensayo.

Alternativamente, se puede evaluar si una proteína o polipéptido proporciona unión intermolecular o unión extramolecular mediante cristalografía y/o modelado molecular (u otras técnicas *in silico* adecuadas). Se generó un modelo de complejo de TNF30/TNF-alfa trimérico basándose en la estructura cristalina del complejo de TNF1/TNF-alfa de tipo natural monomérico. A partir de esta estructura, se modeló el constructo final de TNF30-ligador-ALB8-ligador-TNF30. El constructo de TNF30-ligador-ALB8-ligador-TNF30 se modeló a partir del trímero de TNF $\alpha$  con dos moléculas de TNF30 unidas. Como la estructura de ALB8 no se conoce, se usó en su lugar una tercera molécula de TNF30, que se colocó entre los otros dos nanocuerpos a lo largo de la línea de entre los extremos N y C-terminales. Después se añadieron manualmente los ligadores de 9 aminoácido.

El modelo se muestra en la figura 62. Claramente, los ligadores de 9 aminoácidos junto con ALB8 proporcionan un espacio amplio para abarcar los aproximadamente 66 Å entre los dos dominios TNF30 unidos a TNF $\alpha$ . ALB8 por sí mismo ya abarca 40 Å, y cada ligador puede abarcar otros ~27 Å en conformación completamente extendida. Como resultado, ALB8 tiene bastante flexibilidad de movimiento y no se espera que su unión a albúmina interfiera mucho con la unión a TNF $\alpha$ .

Además, es probable que los ligadores se puedan acortar sin afectar a la avidéz, especialmente en el caso del ligador que es C-terminal de ALB8. Esto puede tener el efecto beneficioso de aumentar la unión al mismo trímero de TNF $\alpha$ .

frente a la reticulación de trímeros, porque la probabilidad de que el segundo TNF30 se asocie con un TNF $\alpha$  diferente aumenta con la longitud del ligador.

5 Como también se describe adicionalmente en el presente documento, un polipéptido multiespecífico de la invención dirigido contra un antígeno deseado y contra al menos una proteína sérica, tal como las proteínas séricas mencionadas más adelante en el presente documento, y en particular contra albúmina sérica humana, puede mostrar un aumento de la semivida en suero, en comparación con el nanocuerpo monovalente correspondiente.

10 Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, los métodos descritos en el presente documento son particularmente adecuados para generar tales polipéptidos multivalentes o multiespecíficos de la invención.

En un polipéptido de la invención, el al menos un nanocuerpo también se puede unir a un dominio V<sub>H</sub> convencional o a un análogo natural o sintético de un dominio V<sub>H</sub>, opcionalmente por medio de una secuencia de ligador.

15 En un polipéptido de la invención, el al menos un nanocuerpo también se puede unir a un dominio V<sub>L</sub> o a un análogo natural o sintético de un dominio V<sub>L</sub>, opcionalmente por medio de una secuencia de ligador, para proporcionar un polipéptido de la invención que está en la forma análoga a un fragmento scFv convencional, pero que contiene un nanocuerpo en vez de un dominio V<sub>H</sub>.

20 En un polipéptido de la invención, el al menos un nanocuerpo también se puede unir a uno o más de un dominio CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y/o CH<sub>3</sub>, opcionalmente por medio de una secuencia de ligador. Por ejemplo, un nanocuerpo unido a un dominio CH<sub>1</sub> adecuado puede usarse, por ejemplo, junto con cadenas ligeras adecuadas, para generar fragmentos/estructuras de anticuerpos análogos a fragmentos Fab o fragmentos F(ab') convencionales, pero en los que uno o (en el caso de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>) uno o ambos de los dominios V<sub>H</sub> convencionales se han reemplazado por un nanocuerpo. Tales fragmentos también pueden ser heteroespecíficos o biespecíficos, es decir dirigidos contra dos o más antígenos. Un nanocuerpo unido a dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> adecuados, por ejemplo derivado de *Camelidae* puede usarse para formar un anticuerpo de cadena pesada monoespecífico o biespecífico. Finalmente, un nanocuerpo unido a dominios CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> adecuados, por ejemplo derivados de un ser humano, puede usarse, junto con cadenas ligeras adecuadas, para formar un anticuerpo que es análogo a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, pero en el que se han reemplazado uno o ambos de los dominios V<sub>H</sub> convencionales por un nanocuerpo.

30 Asimismo, además del uno o más nanocuerpos, los polipéptidos de la invención también pueden contener grupos, restos o residuos funcionales, por ejemplo sustancias terapéuticamente activas, tales como las que se mencionan a continuación, y/o marcadores o etiquetas, tales como marcadores fluorescentes, isótopos, etc., como se describen adicionalmente más adelante en el presente documento.

35 Los nanocuerpos de la invención, los polipéptidos de la invención, y ácidos nucleicos que codifican para los mismos, se pueden preparar de una manera conocida en sí misma, como será evidente para el experto a partir de la descripción adicional en el presente documento. Algunos métodos preferidos, pero no limitativos, para preparar los nanocuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos incluyen los métodos y técnicas mencionados anteriormente y/o descritos adicionalmente más adelante en el presente documento.

40 Como será evidente para el experto, un método particularmente útil para preparar un nanocuerpo y/o un polipéptido de la invención comprende generalmente las etapas de:

45 - la expresión, en una célula huésped u organismo huésped adecuado (también denominado en el presente documento un "huésped de la invención") o en otro sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifica para dicho nanocuerpo o polipéptido de la invención (también denominado en el presente documento un "ácido nucleico de la invención"), opcionalmente seguido por:

50 - aislamiento y/o purificación del nanocuerpo o polipéptido de la invención así obtenido.

En particular, tal método puede comprender las etapas de:

55 - cultivar y/o mantener un huésped de la invención en condiciones tales que dicho huésped de la invención expresa y/o produce al menos un nanocuerpo y/o polipéptido de la invención; opcionalmente seguido por:

- aislar y/o purificar el nanocuerpo o polipéptido de la invención así obtenido.

60 Un ácido nucleico de la invención puede estar en forma de ADN o ARN de cadena simple o doble, y está preferentemente en forma de ADN de cadena doble. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser ADN genómico, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codón que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula huésped u organismo huésped previsto).

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



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

5 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar u obtener de una manera conocida en sí misma, basándose en la información de las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención facilitados en el presente documento, y/o se pueden aislar a partir de una fuente natural adecuada. Para proporcionar análogos, secuencias de nucleótidos que codifican para dominios  $V_{HH}$  que se producen de manera natural se pueden someter, por ejemplo, a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifica para dicho análogo.  
10 Asimismo, como será evidente para el experto, para preparar un ácido nucleico de la invención, también pueden unirse entre sí de una manera adecuada varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica para un nanocuerpo y por ejemplo los ácidos nucleicos que codifican para uno o más ligadores.

15 Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la invención serán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, síntesis de ADN automatizada; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias que se producen de manera natural y/o sintéticas (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 se pueden digerir fácilmente y/o unir usando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción de PCR usando uno o más cebadores “de apareamiento erróneo”, 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 siguientes ejemplos.

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

35 Los constructos genéticos de la invención pueden ser ADN o ARN, y preferentemente son ADN de cadena doble. Los constructos genéticos de la invención también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped u organismo huésped previsto, en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula huésped prevista o en una forma adecuada de replicación, mantenimiento y/o herencia independiente en el organismo huésped previsto. Por ejemplo, los constructos genéticos de la invención pueden estar en forma de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido, YAC, vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir un vector que puede proporcionar la expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula huésped, organismo huésped y/o sistema de expresión adecuado).

En una realización preferida pero no limitativa, un constructo genético de la invención comprende

- 45 a) al menos un ácido nucleico de la invención; conectado operativamente a
- b) uno o más elementos reguladores, tal como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado;
- 50 c) y opcionalmente también
- d) uno o más elementos adicionales de los constructos genéticos conocidos en sí mismos;

en el que los términos “elemento regulador”, “promotor”, “terminador” y “conectado operativamente” tienen sus significados habituales en la técnica (tal como se describen adicionalmente a continuación); y en el que dichos “elementos adicionales” presentes en los constructos genéticos pueden ser, por ejemplo, secuencias UTR 3’ o 5’, secuencias líder, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes indicadores y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficiencia de) la transformación o integración. Estos y otros elementos adecuados para tales constructos genéticos serán evidentes para el experto, y por ejemplo pueden depender del tipo de constructo usado, la célula huésped u organismo huésped previsto; la manera en que las secuencias de nucleótidos de la invención de interés se van a expresar (por ejemplo, por medio de expresión constitutiva, transitoria o inducible); y/o la técnica de transformación que se va a usar.

65 Preferentemente, en los constructos genéticos de la invención, dicho al menos un ácido nucleico de la invención y dichos elementos reguladores, y opcionalmente dicho uno o más elementos adicionales, están “unidos operativamente” entre sí, mediante lo cual se entiende generalmente que están en relación funcional entre sí. Por ejemplo, se considera que un promotor está “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 el que dicha secuencia codificante se debe entender como que está “bajo el control de dicho promotor”). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótidos están unidas operativamente, estarán en la misma orientación y habitualmente también en el mismo marco de lectura. Habitualmente también serán esencialmente contiguas, aunque esto también puede no requerirse.

Preferentemente, los elementos reguladores y adicionales de los constructos genéticos de la invención son de tal modo que sean capaces proporcionar su función biológica prevista en la célula huésped u organismo huésped previsto.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser “operativo” en la célula huésped u organismo huésped previsto, por lo que se entiende 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 está operativamente unido (tal como se define en el presente documento).

Algunos promotores particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotores conocidos en sí mismos para la expresión en células bacterianas, tales como los mencionados más adelante en el presente documento y/o los usados en los ejemplos.

Un marcador de selección debe ser tal que permita, es decir en condiciones de selección apropiadas, distinguir células huésped y/u organismos huésped que se han transformado (satisfactoriamente) con la secuencia de nucleótidos de la invención de células/organismos huésped que no se han transformado (satisfactoriamente). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales marcadores son genes que proporcionan resistencia contra antibióticos (tales como kanamicina o ampicilina), genes que proporcionan resistencia a la temperatura o genes que permiten mantener la célula huésped u organismo huésped en ausencia de determinados factores, compuestos y/o componentes (alimenticios) en el medio que son esenciales para la supervivencia de las células u organismos no transformados.

Una secuencia líder debe ser tal que, en la célula huésped u organismo huésped previsto, permita las modificaciones postraduccionales deseadas y/o tal que dirija el ARNM transcrito a una parte u orgánulo deseado de una célula. Una secuencia líder también puede permitir la secreción del producto de expresión a partir de dicha célula. Como tal, la secuencia líder puede ser cualquier secuencia pro, pre, o prepro operativa en la célula huésped u organismo huésped. Pueden no requerirse secuencias líder para la expresión en una célula bacteriana.

Un marcador de expresión o gen indicador debe ser tal que, en la célula huésped u organismo huésped, permita la detección de la expresión del (un gen o secuencia de nucleótidos presente en el) constructo genético. Un marcador de expresión también puede permitir opcionalmente la localización del producto expresado, por ejemplo en una parte u orgánulo específico de una célula y/o en célula(s), tejido(s), órgano(s) o parte(s) específico(s) de un organismo multicelular. Tales genes indicadores también se pueden expresar como una proteína de fusión con la secuencia de aminoácidos de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, incluyen proteínas fluorescentes tales como GFP.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de promotores, terminadores y elementos adicionales adecuados incluyen los usados en los siguientes ejemplos. 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 invención, tales como terminadores, potenciadores de transcripción y/o traducción y/o factores de integración, se hace referencia a los manuales generales tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.* mencionados anteriormente, así como a los ejemplos que se facilitan en los documentos WO 95/07463, WO 96/23810, WO 95/07463, WO 95/21191, WO 97/11094, WO 97/42320, WO 98/06737, WO 98/21355, US-A-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 los antecedentes generales de la técnica mencionados anteriormente y las referencias adicionales citadas más adelante en el presente documento.

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

A menudo, los constructos genéticos de la invención se obtendrán insertando una secuencia de nucleótidos de la invención en un vector (de expresión) adecuado conocido en sí mismo. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de los vectores de expresión adecuados son los usados en los siguientes ejemplos, así como los que se mencionan a continuación.

Los ácidos nucleicos de la invención y/o los constructos genéticos de la invención pueden usarse para transformar una célula huésped u organismo huésped. El huésped o la célula huésped puede ser cualquier célula o línea celular adecuada (fúngica, procariota o eucariota) o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado, por ejemplo:

- 5 - una cepa bacteriana, incluyendo, pero sin limitarse a, cepas gram-negativas tales como cepas de *Escherichia coli*; de *Proteus*, por ejemplo de *Proteus mirabilis*; de *Pseudomonas*, por ejemplo de *Pseudomonas fluorescens*; y cepas gram-positivas tales como cepas de *Bacillus*, por ejemplo de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por ejemplo de *Streptomyces lividans*; de *Staphylococcus*, por ejemplo de *Staphylococcus carnosus*; y de *Lactococcus*, por ejemplo de *Lactococcus lactis*;
- 10 - una célula fúngica, incluyendo, pero sin limitarse a, células de especies de *Trichoderma*, por ejemplo de *Trichoderma reesei*; de *Neurospora*, por ejemplo de *Neurospora crassa*; de *Sordaria*, por ejemplo de *Sordaria macrospora*; de *Aspergillus*, por ejemplo de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus sojae*; o de otros hongos filamentosos;
- 15 - una célula de levadura, incluyendo, pero sin limitarse a, células de especies de *Saccharomyces*, por ejemplos de *Saccharomyces cerevisiae*; de *Schizosaccharomyces*, por ejemplo de *Schizosaccharomyces pombe*; de *Pichia*, por ejemplo de *Pichia pastoris* o de *Pichia methanolica*; de *Hansenula*, por ejemplo de *Hansenula polymorpha*; de *Kluyveromyces*, por ejemplo de *Kluyveromyces lactis*; de *Arxula*, por ejemplo de *Arxula adenivorans*; de *Yarrowia*, por ejemplo de *Yarrowia lipolytica*;
- una célula o línea celular de anfibio, tal como *Xenopus oocytes*;
- 20 - una célula o línea celular derivada de insecto, tal como células/líneas celulares derivadas de lepidópteros, incluyendo, pero sin limitarse a, células SF9 y Sf21 de *Spodoptera* o células/líneas celulares derivadas de *Drosophila*, tales como células de Schneider y Kc;
- una planta o célula de planta, por ejemplo en plantas de tabaco; y/o
- 25 - una célula o línea celular de mamífero, por ejemplo derivada de una célula o línea celular derivada de un humano, de los mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a, células CHO, células BHK (por ejemplo, células BHK-21) y células o líneas celulares humanas tales células HeLa, COS (por ejemplo, COS-7) y PER.C6;
- 30 así como otros huéspedes o células huésped conocidos en sí mismos para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos de dominio (simple) y fragmentos ScFv), que serán evidentes para el experto. También se hace referencia en los antecedentes generales de la técnica citados anteriormente en el presente documento, así como por ejemplo a los documentos WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken *et al.*, (1998), citado anteriormente; Riechmann y Muyldermans, (1999), citado anteriormente; van der Linden, (2000), citado anteriormente; Thomassen *et al.*, (2002), citado anteriormente; Joosten *et al.*, (2003), citado anteriormente;
- 35 anteriormente; Joosten *et al.*, (2005), citado anteriormente; y las referencias adicionales citadas en el presente documento.
- Los nanocuerpos y polipéptidos de la invención también se pueden introducir y expresar en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo con propósitos profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como una terapia génica). Con este propósito, las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden introducir en células o tejidos de cualquier modo adecuado, por ejemplo como tales (por ejemplo, usando liposomas) o después de haberse insertado en un vector de terapia génica adecuado (por ejemplo, derivado de retrovirus tales como adenovirus, o parvovirus tales como virus adenoasociados). Como también será evidente para el experto, tal terapia génica se puede realizar *in vivo* y/o *in situ* en el cuerpo de un paciente mediante administración de un ácido nucleico de la invención o un vector de terapia génica adecuado que codifica para el mismo al paciente o a células específicas o a un tejido u órgano específico del paciente; o pueden tratarse células adecuadas (a menudo tomadas del cuerpo del paciente que va a tratarse, tales como linfocitos explantados, aspirados de médula ósea o biopsias de tejido) *in vitro* con una secuencia de nucleótidos de la invención y posteriormente reintroducirse de modo adecuado en el cuerpo del paciente. Todo esto se puede realizar usando vectores de terapia génica, técnicas y sistemas de administración que se conocen bien por el experto, por ejemplo Culver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, Nueva York, N.Y., Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 1108-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91; (1998), 30- 36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documentos WO 94/29469; WO 97/00957, US 5.580.859; US 5.589.466 o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Por ejemplo, en la técnica se ha descrito la expresión *in situ* de fragmentos ScFv (Afanasieva *et al.*, Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) y de diacuerpos (Blanco *et al.*, J. Immunol, 171, 1070-1077 (2003)).
- 60 Para la expresión de los nanocuerpos en una célula, también se pueden expresar como los denominados "intracuerpos", por ejemplo, como se describe en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618 y US-A-7004940; el documento WO 03/014960; en Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.
- 65 Para la producción, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención también pueden producirse, por ejemplo, en la leche de mamíferos transgénicos, por ejemplo en la leche de conejos, vacas, cabras u oveja (véanse por ejemplo los

documentos US-A-6.741.957, US-A-6.304.489 y US-A-6.849.992 para técnicas generales para introducir transgenes en mamíferos), en plantas o partes de plantas incluyendo, pero sin limitarse a, sus hojas, flores, frutos, semillas, raíces o tubérculos (por ejemplo, en tabaco, maíz, soja o alfalfa) o por ejemplo en pupas del gusano de seda *Bombyx mori*.

5 Además, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención también se pueden expresar y/o producir en sistemas de expresión libres de células, y los ejemplos adecuados de tales sistemas serán evidentes para el experto. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, incluyen la expresión en el sistema de germen de trigo; en lisados de reticulocitos de conejo; o en el sistema Zubay de *E. coli*.

10 Tal como se mencionó anteriormente, una de las ventajas del uso de nanocuerpos es que los polipéptidos basados en los mismos se pueden preparar mediante la expresión en un sistema bacteriano adecuado, y los sistemas de expresión bacterianos, vectores, células huésped, elementos reguladores, etc., adecuados serán evidentes para el experto, por ejemplo a partir de las referencias citadas anteriormente. Sin embargo, debe observarse que la invención en su sentido más amplio no se limita a la expresión en sistemas bacterianos.

15 Preferentemente, en la invención, se usa un sistema de expresión (*in vivo* o *in vitro*), tal como un sistema de expresión bacteriano, que proporciona los polipéptidos de la invención en una forma que es adecuada para uso farmacéutico, y tales sistemas de expresión de nuevo serán evidentes para el experto. Como también será evidente para el experto, polipéptidos de la invención adecuados para su uso farmacéutico se pueden preparar mediante técnicas para la síntesis de péptidos.

20 Para la producción a escala industrial, los huéspedes heterólogos preferidos para la producción (industrial) de nanocuerpos o productos terapéuticos de proteínas que contienen nanocuerpos incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* que son adecuadas para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para la expresión/producción/fermentación farmacéuticas a gran escala. Los ejemplos adecuados de tales cepas serán evidentes para el experto. Tales cepas y sistemas de producción/expresión también están disponibles en compañías tales como Biovitrum (Uppsala, Suecia).

25 Alternativamente, pueden usarse líneas celulares de mamíferos, en particular células de ovario de hámster chino (CHO), para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular para expresión/producción/fermentación farmacéuticas a gran escala. Además, tales sistemas de expresión/producción también están disponibles en algunas de las compañías mencionadas anteriormente.

30 La elección del sistema de expresión específico dependerá en parte del requerimiento de determinadas modificaciones postraduccionales, más específicamente glicosilación. La producción de una proteína recombinante que contiene nanocuerpo para la que se desea o requiere glicosilación necesitará el uso de huéspedes de expresión de mamíferos que tienen la capacidad de glicosilar la proteína expresada. En este aspecto, será evidente para el experto que el patrón de glicosilación obtenido (es decir, la clase, número y posición de residuos unidos) dependerá de la célula o línea celular que se usa para la expresión. Preferentemente, o bien se usa una célula o línea celular humana (es decir, que conduce a una proteína que tiene esencialmente un patrón de glicosilación humano) o bien se usa otra línea celular de mamífero que puede proporcionar un patrón de glicosilación que es esencial y/o funcionalmente igual a la glicosilación humana o al menos imita la glicosilación humana. Generalmente, los huéspedes procariotas tales como *E. coli* no tienen la capacidad de glicosilar proteínas, y el uso de eucariotas inferiores tales como las levaduras conduce habitualmente a un patrón de glicosilación que difiere de la glicosilación humana. No obstante, se debe entender que todas las células huésped y sistemas de expresión anteriores pueden usarse en la invención, dependiendo del nanocuerpo o proteína deseado que se va a obtener.

35 En consecuencia, según una realización no limitativa de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención está glicosilado. Según otra realización no limitativa de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención no está glicosilado.

40 Según una realización preferida, pero no limitativa, de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula bacteriana, en particular una célula bacteriana adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como células de las cepas mencionadas anteriormente.

45 Según otra realización preferida, pero no limitativa, de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula de levadura, en particular una célula de levadura adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como células de las especies mencionadas anteriormente.

50 Según aún otra realización preferida, pero no limitativa, de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención se produce en una célula de mamífero, en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana, y más en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana que es adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como las líneas celulares mencionadas anteriormente en el presente documento.

55 Cuando se usa la expresión en una célula huésped para producir los nanocuerpos y las proteínas de la invención, los

nanocuerpos y proteínas de la invención o bien pueden producirse de forma celular (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma o en los cuerpos de inclusión) y posteriormente se aíslan de las células huésped y opcionalmente se purifican adicionalmente; o bien pueden producirse de forma extracelular (por ejemplo, en el medio en el que se cultivan las células huésped) y posteriormente se aíslan del medio de cultivo y opcionalmente se purifican adicionalmente.

5 Cuando se usan células huésped eucariotas, habitualmente se prefiere la producción extracelular ya que esto facilita considerablemente el aislamiento adicional y el procesamiento posterior de los nanocuerpos y proteínas obtenidos. Normalmente las células bacterianas tales como las cepas de *E. coli* mencionadas anteriormente no secretan proteínas de forma extracelular, excepto por unas pocas clases de proteínas tales como toxinas y hemolisina, y la producción secretora en *E. coli* se refiere a la translocación de proteínas a través de la membrana interna en el espacio periplásmico. La producción periplásmica proporciona varias ventajas con respecto a la producción citosólica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos N-terminal del producto secretado puede ser idéntica al producto génico natural después de la escisión de la secuencia señal de secreción mediante una peptidasa de señal específica. Asimismo, parece haber mucha menos actividad de proteasa en el periplasma que en el citoplasma. Además, la purificación de la proteína es más simple debido a menos proteínas contaminantes en el periplasma. Otra ventaja es que se pueden formar enlaces disulfuros correctos debido a que el periplasma proporciona un entorno más oxidativo que el citoplasma. Las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* se hallan a menudo en agregados insolubles, denominados cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión se pueden localizar en el citosol o en el periplasma, la recuperación de proteínas biológicamente activas a partir de estos cuerpos de inclusión requiere un proceso de desnaturalización/replegado. Muchas proteínas recombinantes, incluyendo proteínas terapéuticas, se recuperan a partir de cuerpos de inclusión. Alternativamente, como será evidente para el experto, pueden usarse cepas recombinantes de bacterias que se han modificado genéticamente para secretar una proteína deseada, y en particular un nanocuerpo o un polipéptido de la invención.

25 En consecuencia, según una realización no limitativa de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención es un nanocuerpo o polipéptido que se ha producido de forma intracelular y que se ha aislado de la célula huésped, y en particular de una célula bacteriana o de un cuerpo de inclusión en una célula bacteriana. Según otra realización no limitativa de la invención, el nanocuerpo o polipéptido de la invención es un nanocuerpo o polipéptido que se ha producido de forma extracelular y que se ha aislado del medio en el que se cultiva la célula huésped.

30 Algunos promotores preferidos, pero no limitativos, para su uso con estas células huésped incluyen,

- para la expresión en *E. coli*: promotor lac (y derivados del mismo tales como el promotor lacUV5); promotor de arabinosa, promotor de fago lambda izquierdo (PL) y derecho (PR); promotor del operón trp; promotores lac/trp híbridos (tac y trc); promotor de T7 (más específicamente el del gen 10 del fago T7) y otros promotores de fago T; promotor del gen de resistencia de tetraciclina de Tn10; variantes diseñadas por ingeniería de los promotores anteriores que incluyen una o más copias de una secuencia del operador regulador exógeno;

40 - para la expresión en *S. cerevisiae*: constitutiva: ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), ENO (enolasa), CYC1 (citocromo c iso-1), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); PGK1 (fosfoglicerato cinasa), PYK1 (piruvato cinasa); regulada: GAL1,10,7 (enzimas de galactosa metabólica), ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2), PHO5 (fosfatasa ácida), CUP1 (metalotioneína de cobre); heteróloga: CaMV (promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor);

- para la expresión en *Pichia pastoris*: el promotor AOX1 (alcohol oxidasa I)

45 - para la expresión en células de mamífero: potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMVh); variante del promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVh) que contiene dos secuencias operadoras de tetraciclina de modo que el promotor se puede regular con el represor Tet, promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple (TK); potenciador/promotor de la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous (LTR de VSR); promotor del factor de elongación 1 $\alpha$  (hEF-1 $\alpha$ ) de humano, chimpancé, ratón o rata; el promotor temprano de VS40; promotor de la repetición terminal larga VIH-1; promotor de  $\beta$ -actina;

Algunos vectores preferidos, pero no limitativos, para su uso con estas células huésped incluyen:

55 - vectores para la expresión en células de mamífero: pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-I (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;

60 - vectores para la expresión en células bacterianas: vectores pET (Novagen) y vectores pQE (Qiagen);

- vectores para la expresión en levadura u otras células fúngicas: pYES2 (Invitrogen) y vectores de expresión de *Pichia* (Invitrogen);

65 - vectores para la expresión en células de insectos: pBlueBacII (Invitrogen) y otros vectores de baculovirus

- vectores para la expresión en plantas o células de plantas: por ejemplo vectores basados en virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco, cepas adecuadas de *Agrobacterium*, o vectores basados en plásmido Ti.

Algunas secuencias secretoras preferidas, pero no limitativas, para su uso con estas células huésped incluyen:

- para su uso en células bacterianas tales como *E. coli*: PelB, Bla, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, StII, PhoA, PhoE, MalE, Lpp, LamB y similares; péptido señal TAT, señal de secreción C-terminal de hemolisina

- para su uso en levaduras: secuencia prepro de factor de apareamiento  $\alpha$ , fosfatasa (pho1), invertasa (Suc), etc.;

- para su uso en células de mamífero: señal indígena en el caso en el que la proteína diana es de origen eucariota, péptido señal de V-J2-C de cadena  $\kappa$  de Ig; etc.

Técnicas adecuadas para transformar un huésped o célula huésped de la invención serán evidentes para el experto y pueden depender de la célula huésped/organismo huésped previsto y del constructo genético que va a usarse. De nuevo se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente.

Después de la transformación, se puede realizar una etapa para detectar y seleccionar las células huésped u organismos huésped que se han transformado satisfactoriamente con la secuencia de nucleótidos/constructo genético de la invención. Por ejemplo, esto puede ser una etapa de selección basada en un marcador seleccionable presente en el constructo genético de la invención o una etapa que implica la detección de la secuencia de aminoácidos de la invención, por ejemplo usando anticuerpos específicos.

La célula huésped transformada (que pueden estar en forma de una línea celular estable) u organismos huésped (que puede estar en forma de una línea o cepa mutante estable) forman aspectos adicionales de la presente invención.

Preferentemente, estas células huésped u organismos huésped son tales que expresan, o son capaces de expresar (al menos) (por ejemplo, en condiciones adecuadas), una secuencia de aminoácidos de la invención (y en el caso de un organismo huésped: en al menos una célula, parte, tejido u órgano del mismo). La invención también incluye generaciones adicionales, progenie y/o descendencia de la célula huésped u organismo huésped de la invención, que por ejemplo puede obtenerse mediante división celular o mediante reproducción sexual o asexual.

Para producir/obtener la expresión de las secuencias de aminoácidos de la invención, la célula huésped transformada u organismo huésped transformado generalmente se puede conservar, mantener y/o cultivar en condiciones tales que se expresa/produce la secuencia de aminoácidos (deseada) de la invención. Las condiciones adecuadas serán evidentes para el experto y habitualmente dependerán de la célula huésped/organismo huésped usado así como de los elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia de nucleótidos (relevante) de la invención. De nuevo, se hace referencia en los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente en los párrafos sobre los constructos genéticos de la invención.

Generalmente, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada, y opcionalmente la presencia de un compuesto o factor de inducción adecuado (por ejemplo, cuando las secuencias de nucleótidos de la invención están bajo el control de un promotor inducible); todas las cuales pueden seleccionarse por el experto. De nuevo, en tales condiciones, las secuencias de aminoácidos de la invención se pueden expresar de una manera constitutiva, de una manera transitoria o solo cuando se inducen adecuadamente.

También será evidente para el experto que la secuencia de aminoácidos de la invención se puede generar (en primer lugar) en una forma inmadura (tal como se mencionó anteriormente), que posteriormente se puede someter a la modificación postraducciona, dependiendo de la célula huésped/organismo huésped usado. Asimismo, la secuencia de aminoácidos de la invención se puede glicosilar, de nuevo dependiendo de la célula huésped/organismo huésped usado.

La secuencia de aminoácidos de la invención se puede aislar posteriormente de la célula huésped/organismo huésped y/o del medio en el que se cultivó dicha célula huésped u organismo huésped, usando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas en sí mismas, tales como técnicas de cromatografía (preparativa) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo, usando una secuencia de aminoácidos escindible específica, fusionada con la secuencia de aminoácidos de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir, usando anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos que va a aislarse).

Generalmente, para el uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención de las invenciones se pueden formular como una preparación farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos adicionales farmacéuticamente activos. A modo de ejemplos no limitativos, tal formulación puede estar en una forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica, para administración por inhalación,

mediante un parche cutáneo, mediante un implante, mediante un supositorio, etc. Tales formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la manera de administración, así como métodos y portadores para su uso en la preparación de las mismas, serán evidentes para el experto, y se describen adicionalmente más adelante en el presente documento.

5 Generalmente, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden formular y administrar en cualquier manera adecuada conocida en sí misma, para lo que se hace referencia por ejemplo a los antecedentes generales de la técnica citados anteriormente (y en particular a los documentos WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865 y WO 10 04/041867) así como a los manuales convencionales, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, EE.UU. (1990) o Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Lippincott Williams and Wilkins (2005).

15 Por ejemplo, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden formular y administrar de cualquiera manera conocida en sí misma para anticuerpos y fragmentos de anticuerpo convencionales (incluyendo ScFv y diacuerpos) y otras proteínas farmacéuticamente activas. Tales formulaciones y métodos para preparar las mismas serán evidentes para el experto, y por ejemplo incluyen preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intraarterial o intratecal) o para administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

20 Las preparaciones para administración parenteral pueden ser, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que son adecuadas para infusión o inyección. Los portadores o diluyentes adecuados para tales preparaciones incluyen, por ejemplo, sin limitación, agua estéril y tampones acuosos y disoluciones tales como solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, disolución de dextrosa y solución de Hank; 25 aceites acuosos; glicerol; etanol; glicoles tales como propilenglicol o así como aceites minerales, aceites animales y aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja, así como mezclas adecuadas de los mismos. Habitualmente, se preferirán disoluciones o suspensiones acuosas.

30 Los nanocuerpos y polipéptidos de la invención también pueden administrarse usando métodos de administración de terapia génica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.399.346, que se incorpora como referencia en su totalidad. Usando un método de administración de terapia génica, células primarias transfectadas con el gen que 35 codifica para un nanocuerpo o polipéptido de la invención se pueden transfectar adicionalmente con promotores específicos de tejido para seleccionar como diana órganos, tejido, injertos, tumores o células específicos y adicionalmente se pueden transfectar con secuencias señal y de estabilización para la expresión localizada de forma subcelular.

40 En consecuencia, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden administrarse de manera sistémica, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir para dar comprimidos, o se pueden incorporan directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para 45 la administración terapéutica oral, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden combinar con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1% del nanocuerpo o polipéptido de la invención. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, evidentemente, se puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad del nanocuerpo o polipéptido de la invención en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

50 Los comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas y similares también pueden contener los siguientes: aglutinantes tales como goma tragacanto, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente aromatizante tal como menta piperita, aceite de gaulteria o aromatizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, 55 tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, pastillas o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener los nanocuerpos y polipéptidos de la invención, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Evidentemente, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente 60 aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

65 Las preparaciones y formulaciones para administración oral también se pueden dotar de una cubierta entérica que permitirá que los constructos de la invención resistan el entorno gástrico y pasen a los intestinos. Más generalmente, las preparaciones y formulaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para la administración a cualquier parte deseada del tracto gastrointestinal. Además, pueden usarse supositorios adecuados para la

administración al tracto gastrointestinal.

Los nanocuerpos y polipéptidos de la invención también pueden administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Se pueden preparar disoluciones de los nanocuerpos y polipéptidos de la invención o sus sales en agua, opcionalmente mezclada con un tensioactivo no tóxico. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que están adaptados para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables o infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación definitiva debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan mediante incorporación de los nanocuerpos y polipéptidos de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros componentes indicados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y de liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional presente en las disoluciones anteriormente esterilizadas por filtración.

Para la administración tópica, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden aplicar en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, en general será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxiaquilos o glicoles o combinaciones de agua-alcohol/glicol, en los que los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden disolver o dispersar a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden añadir adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de almohadillas absorbentes, usarse para impregnar vendas y otros apósitos, o pulverizarse sobre la zona afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol.

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

En la técnica se conocen ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden usarse para administrar los nanocuerpos y polipéptidos de la invención a la piel; por ejemplo, véanse Jacquet *et al.* (patente estadounidense n.º 4.608.392), Geria (patente estadounidense n.º 4.992.478), Smith *et al.* (patente estadounidense n.º 4.559.157) y Wortzman (patente estadounidense n.º 4.820.508).

Las dosificaciones útiles de los nanocuerpos y polipéptidos de la invención se pueden determinar comparando su actividad *in vitro*, y la actividad *in vivo* en modelos animales. En la técnica se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones, y otros animales, a humanos; por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 4.938.949.

Generalmente, la concentración de los nanocuerpos y polipéptidos de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de desde aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferentemente desde aproximadamente el 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5% en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5-2,5% en peso.

La cantidad de los nanocuerpos y polipéptidos de la invención requerida para su uso en el tratamiento variará no solo con el nanocuerpo o polipéptido particular seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que esté tratándose y la edad y el estado del paciente y en última instancia será a criterio del médico o clínico encargado. Asimismo la dosificación de los nanocuerpos y polipéptidos de la invención varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto u órgano diana.



5 La dosis deseada se puede presentar de modo conveniente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones diferenciadas libremente espaciadas; tales como múltiples inhalaciones de un insuflador o mediante aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

10 Un régimen de administración puede incluir tratamiento diario a largo plazo. Por "largo plazo" se entiende al menos dos semanas y, preferentemente, varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación puede determinarlas por un experto habitual en la técnica usando solo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ajustarse por el médico individual en el caso de alguna complicación.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o un trastorno relacionado con TNF tal como se menciona en el presente documento, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

20 En el contexto de la presente invención, el término "prevención y/o tratamiento" no solo comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, sino que generalmente también comprende prevenir la aparición de la enfermedad, ralentizar o revertir la progresión de la enfermedad, prevenir o ralentizar la aparición de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir y/o aliviar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir la gravedad y/o la duración de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma y/o prevenir un aumento adicional de la gravedad de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma, prevenir, reducir o revertir cualquier daño fisiológico provocado por la enfermedad, y generalmente cualquier acción farmacológica que es beneficiosa para el paciente que está tratándose.

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

35 La invención también se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o un trastorno que se puede prevenir y/o tratar mediante administración de un nanocuerpo o polipéptido de la invención a un paciente, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

40 Más en particular, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o un trastorno elegido del grupo que consiste en las enfermedades y los trastornos indicados en el presente documento, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

45 En otra realización, la invención se refiere a un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, método que comprende administrar a un sujeto que padece o corre el riesgo de padecer las enfermedades y los trastornos mencionados en el presente documento, una cantidad farmacéuticamente activa de un nanocuerpo de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que comprende los mismos.

50 En los métodos anteriores, los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos pueden administrarse de cualquier manera adecuada, dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica usada. En consecuencia, los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos por ejemplo pueden administrarse por vía oral, por vía intraperitoneal (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular o por medio de cualquier otra vía de administración que eluda el aparato gastrointestinal), por vía intranasal, por vía transdérmica, de manera tópica, por medio de un supositorio, por inhalación, de nuevo dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica que va a usarse. El médico clínico podrá seleccionar una vía de administración adecuada y una formulación o composición farmacéutica adecuada para usarse en tal administración, dependiendo de la enfermedad o el trastorno que va a prevenirse o tratarse y otros factores que conoce bien el médico clínico.

60 Los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos se administran según un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o el trastorno que va a prevenirse o tratarse. El médico clínico generalmente será capaz de determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o el trastorno que va a prevenirse o tratarse, la gravedad de la enfermedad que va a tratarse y/o la intensidad de sus síntomas, el nanocuerpo o polipéptido específico de la invención que va a usarse, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica que va a usarse, la edad, el sexo, peso, dieta, estado general del paciente, y factores similares que conoce bien el médico clínico.

5 Generalmente, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de uno o más nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención, o de una o más composiciones que comprenden los mismos, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente eficaces. Las cantidades o dosis específicas para administrar pueden ser determinadas por el médico clínico, de nuevo basándose en los factores mencionados anteriormente.

10 Generalmente, para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos mencionados en el presente documento y dependiendo de la enfermedad o el trastorno específico que va a tratarse, la potencia del nanocuerpo y polipéptido específico de la invención que va a usarse, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica específica usada, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención generalmente se administrarán en una cantidad de entre 1 gramo y 0,01 microgramos por kilo de peso corporal al día, preferentemente entre 0,1 gramos y 0,1 microgramos por kg de peso corporal al día, tal como aproximadamente 1, 10, 100 ó 1000 microgramos por kg de peso corporal al día, o bien de manera continua (por ejemplo, por infusión), como una dosis diaria única o bien como múltiples dosis divididas durante el día. El médico clínico generalmente será capaz de determinar una dosis diaria adecuada, según los factores mencionados en el presente documento. También será evidente que en casos específicos, el médico clínico puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo basándose en los factores citados anteriormente y su criterio experto. Generalmente, puede obtenerse cierta orientación sobre las cantidades que han de administrarse a partir de las cantidades administradas habitualmente para los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo convencionales comparables contra la misma diana administrada esencialmente por la misma vía, teniendo en cuenta sin embargo, las diferencias en afinidad/avidez, eficacia, biodistribución, semivida y factores similares que conoce bien el experto.

25 Habitualmente, en el método anterior, se usará un único nanocuerpo o polipéptido de la invención. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención usar dos o más nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención en combinación.

30 Los nanocuerpos y polipéptidos de la invención también pueden usarse en combinación con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir como un régimen de tratamiento combinado, que puede conducir o no a un efecto sinérgico. De nuevo, el médico clínico será capaz de seleccionar tales compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basándose en los factores citados anteriormente y su criterio experto.

35 En particular, los nanocuerpos y polipéptidos de la invención pueden usarse en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos que son o pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos mencionados en el presente documento, como resultado de lo cual puede obtenerse o no un efecto sinérgico. Los ejemplos de tales compuestos y principios, así como vías, métodos y formulaciones o composiciones farmacéuticas para administrarlos serán evidentes para el médico clínico.

40 Cuando dos o más sustancias o principios van a usarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, pueden administrarse por la misma vía de administración o por diferentes vías de administración, esencialmente al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, esencialmente de forma simultánea, consecutiva, o según un régimen alternativo). Cuando las sustancias o los principios se administran de forma simultánea por la misma vía de administración, pueden administrarse como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o como parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, tal como será evidente para el experto.

45 Asimismo, cuando se usan dos o más sustancias o principios activos: como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o los principios pueden administrarse en la misma cantidad y según el mismo régimen que se usa cuando el compuesto o principio se usa por sí mismo, y tal uso combinado puede conducir o no a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de dos o más sustancias o principios activos conduce a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de una, más o todas las sustancias o los principios que van a administrarse, mientras que todavía se obtiene la acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil, por ejemplo, para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario no deseado que se asocia con el uso de una o más de las sustancias o los principios cuando se usan en sus cantidades habituales, mientras que todavía se obtiene el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

55 La eficacia del régimen de tratamiento usado según la invención se puede determinar y/o seguir de cualquiera manera conocida en sí misma para la enfermedad o el trastorno implicado, tal como será evidente para el médico clínico. El médico clínico también será capaz, cuando sea apropiado y/o en una base caso por caso, de cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para obtener el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados y/o alcanzar un equilibrio apropiado entre lograr el efecto terapéutico deseado por una parte y evitar, limitar o reducir efectos secundarios no deseados por otra parte.

60 Generalmente, el régimen de tratamiento se seguirá hasta obtener el efecto terapéutico deseado y/o durante todo el tiempo en el que se mantiene el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede determinarlo el médico clínico.

65 En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un nanocuerpo de la invención o al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador adecuado (es

decir, un portador adecuado para uso veterinario), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

La invención también se refiere al uso de un nanocuerpo de la invención y/o de un polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica, en particular en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento (incluyendo pero sin limitarse al alivio de al menos un síntoma) de una enfermedad o un trastorno mediado por TNF-alfa y/o asociado con TNF-alfa (por ejemplo, asociado con una actividad anómala de TNF-alfa, niveles anómalos de TNF-alfa, expresión anómala de TNF-alfa y/o sensibilidad o respuesta anómala a TNF-alfa) o de uno de los fenómenos biológicos asociados con TNF-alfa tales como una de las enfermedades o los trastornos mencionados anteriormente.

La invención también se refiere al uso del dominio variable de inmunoglobulina de la invención para prevenir y/o tratar (incluyendo pero sin limitarse al alivio de al menos un síntoma) de una enfermedad o un trastorno mediado por TNF-alfa y/o asociado con TNF-alfa (por ejemplo, asociado con actividad anómala de TNF-alfa, niveles anómalos de TNF-alfa, expresión anómala de TNF-alfa y/o sensibilidad o respuesta anómala a TNF-alfa, o de uno de los fenómenos biológicos asociados con TNF-alfa), tal como una de las enfermedades o los trastornos mencionados anteriormente, método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente activa de un nanocuerpo de la invención, de polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica tal como se describió anteriormente.

La presente invención proporciona polipéptidos que comprende uno o más nanocuerpos dirigidos hacia el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). La presente invención se refiere además a su uso en diagnóstico y terapia. Tales anticuerpos pueden tener una secuencia de entramado con alta homología con las secuencias de entramado humanas. Se describen composiciones que comprenden anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) solos o en combinación con otros fármacos.

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

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

Sin embargo ninguno de los fármacos disponibles actualmente son completamente eficaces para el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria, y la mayor parte están limitados por toxicidad grave. Además, es extremadamente difícil y un proceso prolongado desarrollar una nueva entidad química (NEQ) con suficiente potencia y selectividad para tal secuencia diana. Por otra parte los agentes terapéuticos basados en anticuerpos tienen un potencial significativo como fármacos debido a que tienen especificidad exquisita por su diana y una baja toxicidad intrínseca. Además, el tiempo de desarrollo se puede reducir de forma considerable en comparación con el desarrollo de nuevas entidades químicas (NEQ). Sin embargo, los anticuerpos convencionales son difíciles de producir contra proteínas multiméricas en las que el dominio de unión al receptor del ligando está incrustado en un surco, como es en el caso con TNF-alfa. Se sabe que los anticuerpos de cadena pesada descritos en la invención que derivan de *Camelidae*, tienen propensión de unión a la cavidad (WO97/49805; Lauwereys *et al*, EMBO J. 17, 5312, 1998)). En consecuencia, tales anticuerpos de cadena pesada son adecuados de manera intrínseca para la unión a dominios de unión al receptor de tales ligandos como TNF. Además, se sabe que tales anticuerpos son estables durante periodos de tiempo más largos, aumentando en consecuencia su semivida (Perez *et al*, Biochemistry, 40, 74, 2001). Además, tales fragmentos del anticuerpo de cadena pesada pueden producirse "en masa" en fermentadores mediante sistemas de expresión económicos en comparación con la fermentación de cultivo de células de mamífero, tal como levaduras u otros microorganismos (documento EP 0 698 097).

El uso de anticuerpos derivados de fuentes tales como ratón, oveja, cabra, conejo, etc., y sus derivados humanizados como tratamiento para estados que requieren una modulación de la inflamación es problemático por varios motivos. Los anticuerpos tradicionales no son estables a temperatura ambiente, y deben refrigerarse para la preparación y el almacenamiento, lo que requiere equipos de laboratorio, almacenamiento y transporte refrigerados necesarios, lo que contribuye al tiempo y gasto. La refrigeración algunas veces no es factible en los países en desarrollo. Además, la fabricación o producción a pequeña escala de dichos anticuerpos es costosa porque los sistemas celulares de mamífero necesarios para la expresión de anticuerpos intactos y activos requieren altos niveles de soporte en términos de tiempo y equipos, y los rendimientos son muy bajos. Por otra parte, el tamaño grande de los anticuerpos convencionales, restringirá la penetración del tejido, por ejemplo, en el sitio del tejido inflamado. Además, los

anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende del pH, y en consecuencia son inadecuados para su uso en entornos fuera del intervalo de pH fisiológico habitual tal como, por ejemplo, para tratar hemorragia gástrica, cirugía gástrica. Además, los anticuerpos tradicionales son inestables a pH bajo o alto y en consecuencia no son adecuados para administración oral. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos de *Camelidae* resisten condiciones duras, tales como pH extremo, reactivos desnaturizantes y altas temperaturas (Dumoulin *et al*, Protein Science I, 500, 2002), haciendo de este modo que sean adecuados para el suministro mediante administración oral. Por otra parte, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión, que depende de la temperatura, y en consecuencia no son adecuados para su uso en los ensayos o kits realizados a temperaturas fuera de los intervalos de temperatura biológicamente activos (por ejemplo,  $37 \pm 20^\circ\text{C}$ ).

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

Otro importante inconveniente de los anticuerpos convencionales es que son moléculas grandes y complejas, y en consecuencia son relativamente inestables, y son sensibles a la degradación por proteasas. Esto significa que los fármacos de anticuerpos convencionales no pueden administrarse por vía oral, por vía sublingual, por vía tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o por inhalación debido a que no son resistentes al pH bajo en estos sitios, la acción de las proteasas en estos sitios y en la sangre y/o debido a su gran tamaño. Han de administrarse mediante inyección (por vía intravenosa, por vía subcutánea, etc.) para superar algunos de estos problemas. La administración mediante inyección requiere el entrenamiento del especialista para usar una jeringa o aguja hipodérmica de forma correcta y segura. También se requieren equipos estériles, una formulación líquida del polipéptido terapéutico, acondicionamiento de vial de dicho polipéptido de una forma estéril y estable y, del sujeto, un sitio adecuado para la entrada de la aguja. Por otra parte, los sujetos experimentan comúnmente estrés físico y psicológico antes y después de recibir una inyección. En consecuencia, existe la necesidad de un método para la administración de polipéptidos terapéuticos que evite la necesidad de inyección que no solo ahorre coste/tiempo, sino que también sea más conveniente y más cómodo para el sujeto.

Los agentes terapéuticos basados en nanocuerpos tienen un potencial significativo como fármacos ya que tienen especificidad exquisita por su diana y una baja toxicidad intrínseca. Sin embargo, la mejora adicional de su afinidad intrínseca y funcional puede conducir a muchos beneficios para un paciente tales como reducción de la dosis de agente terapéutico, terapia más rápida y reducción de efectos secundarios.

Una realización de la presente invención es un nanocuerpo anti-TNF-alfa, tal como se define por las reivindicaciones.

Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende al menos un nanocuerpo anti-TNF-alfa, tal como se define por las reivindicaciones.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones que comprende además al menos un nanocuerpo dirigido contra una proteína sérica.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones en el que dicha proteína sérica es cualquiera de albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones que comprende además al menos un nanocuerpo seleccionado del grupo que consiste en nanocuerpo anti-IFN-gamma, nanocuerpo anti-receptor de TNF-alfa y nanocuerpo anti-receptor de IFN-gamma.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, en el que el número de nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa es al menos dos.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, en el que al menos un nanocuerpo es un  $V_{\text{HH}}$  de *Camelidae* humanizado.

Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como

se define por las reivindicaciones y al menos un nanocuerpo del grupo que consiste en nanocuerpo anti-IFN-gamma, nanocuerpo anti-receptor de TNF-alfa y nanocuerpo anti-receptor de IFN-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.

5 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, o una composición tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho nanocuerpo es una secuencia homóloga, una porción funcional, o una porción funcional de una secuencia homóloga del nanocuerpo de longitud completa.

10 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, o una composición tal como se define por las reivindicaciones, en el que el polipéptido anti-TNF-alfa es una secuencia homóloga, una porción funcional, o una porción funcional de una secuencia homóloga del polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa.

15 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, o una composición tal como se define por las reivindicaciones en el que al menos un nanocuerpo es un  $V_{HH}$  de *Camelidae*.

20 Otra realización de la presente invención es un ácido nucleico que codifica para un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones.

Otra realización de la presente divulgación es un método de identificación de un agente que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, al factor de necrosis tumoral alfa que comprende las etapas de:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otra realización de la presente divulgación es un agente desconocido que modula la unión de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente al factor de necrosis tumoral alfa, identificado según el método tal como se describió anteriormente.

65 Otra realización de la presente divulgación es un agente desconocido que modula trastornos mediados por el factor

de necrosis tumoral alfa, identificado según los métodos tal como se describieron anteriormente.

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

10 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, o un ácido nucleico tal como se define por las reivindicaciones, o una tal como se define por las reivindicaciones, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con procesos inflamatorios.

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

20 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el entorno gástrico sin que se inactive la sustancia.

25 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el entorno gástrico sin que se inactive la sustancia\_

30 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

35 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

40 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la nariz, vías respiratorias altas y/o pulmón.

45 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la nariz, vías respiratorias altas y/o pulmón.

50 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

55 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

60 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua de forma eficaz.

65 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua de forma eficaz.

Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o

una composición tal como se define por las reivindicaciones, para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel de forma eficaz.

5 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones o una composición tal como se define por las reivindicaciones, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel de forma eficaz.

10 Otra realización de la presente invención es un ácido nucleico tal como se define por las reivindicaciones, uso de un ácido nucleico tal como se define por las reivindicaciones, una composición tal como se define por las reivindicaciones, uso de una composición tal como se define por las reivindicaciones, un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, uso de un polipéptido anti-TNF-alfa en el que dichos trastornos son cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, EPOC, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, diabetes tipo I, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis y vasculitis.

20 Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un ácido nucleico o agente , un polipéptido anti-TNF-alfa o una composición tal como se define por las reivindicaciones, y un vehículo farmacéutico adecuado.

25 Otra realización de la presente divulgación es un método de diagnóstico de un trastorno caracterizado por la disfunción del factor de necrosis tumoral alfa, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra con un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente,

30 (b) detectar la unión de dicho polipéptido a dicha muestra, y

(c) comparar la unión detectada de la etapa (b) con un patrón, en el que una diferencia en la unión con relación a dicha muestra es diagnóstico de un trastorno caracterizado por la disfunción del factor de necrosis tumoral alfa.

35 Otra realización de la presente divulgación es un kit para detectar un trastorno mencionado anteriormente, usando un método tal como se describió anteriormente.

Otra realización de la presente divulgación es un kit para detectar un trastorno mencionado anteriormente que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa aislado tal como se define por las reivindicaciones.

40 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones para la purificación de dicho factor de necrosis tumoral alfa.

45 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones para inhibir la interacción entre el factor de necrosis tumoral alfa y uno o más receptores del factor de necrosis tumoral alfa.

Otra realización de la presente divulgación es un método para producir un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se describió anteriormente, que comprende:

50 (a) obtener ADN bicatenario que codifica para un  $V_{HH}$  de *Camelidae* dirigido al factor de necrosis tumoral alfa,

(b) clonar y expresar el ADN seleccionado en la etapa (b).

55 Otra realización de la presente divulgación es un método de producción de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones que comprende:

(a) cultivar las células huésped que comprende ácido nucleico capaz de codificar para un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, en condiciones que permiten la expresión del polipéptido, y,

60 (b) recuperar el polipéptido producido del cultivo.

Otra realización de la presente invención es un método tal como se define por las reivindicaciones, en el que dichas células huésped son bacterianas o de levadura.

65 Otra realización de la presente invención es un kit para detectar cualquiera de inflamación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal o esclerosis múltiple, que comprende un

polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones.

Los  $V_{HH}$ , según la presente invención, y tal como conoce el destinatario experto son dominios variables de cadena pesada derivados de inmunoglobulinas desprovistas naturalmente de las cadenas ligeras tales como los derivados de *Camelidae* tal como se describe en el documento WO 94/04678 (y a los que se hace referencia a continuación en el presente documento como dominios  $V_{HH}$  o nanocuerpos). Las moléculas de  $V_{HH}$  son aproximadamente 10x más pequeñas que las moléculas de IgG. Son polipéptidos sencillos y muy estables, que resisten condiciones extremas de pH y/o temperatura. Además, son resistentes a la acción de las proteasas, lo que no es el caso para los anticuerpos convencionales. Además, la expresión *in vitro* de los  $V_{HH}$  produce  $V_{HH}$  funcionales plegados apropiadamente de alto rendimiento. Además, los anticuerpos generados en los camélidos reconocerán epítomos diferentes de los reconocidos por los anticuerpos generados *in vitro* mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos o por medio de la inmunización de mamíferos diferentes de los camélidos (documento WO 9749805). Como tal, los  $V_{HH}$  anti-TNF-alfa pueden interactuar más eficientemente con TNF-alfa que los anticuerpos convencionales, bloqueando de este modo su interacción con el receptor de TNF-alfa de modo más eficiente.

TNF-alfa también es el fragmento de TNF-alfa, capaz de inducir una respuesta inmunitaria. TNF-alfa también es un fragmento de TNF-alfa, capaz de unirse a un nanocuerpo producido contra el TNF-alfa de longitud completa.

Un nanocuerpo dirigido contra TNF-alfa significa el nanocuerpo que es capaz de unirse a TNF-alfa con una afinidad mejor que  $10^{-6}$  M.

Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF, en el que los nanocuerpos comprenden  $V_{HH}$  de *Camelidae* dirigidos contra TNF-alfa.

El uno o más nanocuerpos del polipéptido anti-TNF que se dirigen contra un TNF-alfa pueden tener la misma secuencia. Alternativamente pueden no tener todos la misma secuencia. Está dentro del alcance de la invención que un polipéptido anti-TNF comprenda nanocuerpos anti-TNF-alfa que no comparten todos la misma secuencia, pero que se dirigen contra la misma diana, uno o más antígenos de la misma.

La presente invención también se refiere a un polipéptido anti-TNF alfa descrito y reivindicado en el presente documento, en dicho nanocuerpo es un  $V_{HH}$  dirigido contra TNF-alfa, en el que el  $V_{HH}$  pertenece a una clase que tiene secuencias de tipo humana. La clase se caracteriza porque los  $V_{HH}$  portan un aminoácido del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, treonina, asparagina, o glutamina en la posición 45, tal como, por ejemplo, L45 y un triptófano en la posición 103, según la numeración de Kabat. Otra clase de tipo humana de los nanocuerpos de *Camelidae* se ha descrito en el documento WO03035694 y contienen los residuos FR2 hidrófobos que se hallan normalmente en los anticuerpos convencionales de origen humano o de otra especie, pero que compensa esta pérdida de hidrofiliidad con el residuo de arginina cargado en la posición 103 que sustituye el residuo de triptófano conservado presente en VH de los anticuerpos de cadena doble. Como tal, los péptidos pertenecientes a estas dos clases muestran una alta homología de secuencia de aminoácidos con las regiones de entramado de VH humano y dichos péptidos se podrían administrar a un humano de forma directa sin expectativas de una respuesta inmunitaria no deseada del mismo, y sin la carga de humanización adicional. La invención también se refiere a los ácidos nucleicos capaces de codificar para dichos polipéptidos.

Cualquiera de los  $V_{HH}$  tal como se usan por la invención puede ser de la clase tradicional o de las clases de anticuerpos de *Camelidae* de tipo humano. Dichos anticuerpos se pueden dirigir contra TNF-alfa completo o un fragmento del mismo, o un fragmento de una secuencia homóloga del mismo. Estos polipéptidos incluyen los anticuerpos de *Camelidae* de longitud completa, a saber dominios Fc y  $V_{HH}$ , versiones quiméricas de los anticuerpos de *Camelidae* de cadena completa con un dominio Fc o  $V_{HH}$  humano por sí mismos o fragmentos derivados.

Los  $V_{HH}$  anti-albúmina sérica pueden interactuar de una manera más eficiente con albúmina sérica que los anticuerpos convencionales que se sabe que es una proteína transportadora. Como proteína transportadora, algunos de los epítomos de la albúmina sérica pueden ser inaccesibles para proteínas, péptidos y compuestos químicos pequeños unidos. Debido a que se sabe que los  $V_{HH}$  se unen a epítomos "inusuales" o no convencionales tales como cavidades (documento WO 97149805), se puede aumentar la afinidad de tales  $V_{HH}$  para la albúmina circulante.

La presente invención también se refiere al hallazgo de que un polipéptido anti-TNF tal como se describe en el presente documento que comprende además uno o más nanocuerpos dirigidos contra una o más proteínas séricas de un sujeto, de modo sorprendente presenta una semivida significativamente prolongada en la circulación de dicho sujeto en comparación con la semivida del nanocuerpo anti-TNF-alfa cuando no forma parte de dicho constructo. Por otra parte, se halló que los dichos polipéptidos muestran las mismas propiedades favorables de los nanocuerpos tales como alta estabilidad que continúa intacta en ratones, resistencia a pH extremo, estabilidad a alta temperatura y alta afinidad por la diana.

La proteína sérica puede ser cualquier proteína adecuada hallada en el suero del sujeto. En un aspecto de la invención, la proteína sérica es albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina o fibrinógeno. Dependiendo del uso pretendido tal como la semivida requerida para el tratamiento eficaz y/o compartimentalización



del antígeno diana, la pareja de V<sub>HH</sub> se puede dirigir a una de las anteriores proteínas séricas.

Según un aspecto específico, pero no limitativo de la invención, el nanocuerpo contra albúmina sérica humana consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en el que:

(iv) CDR1 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

SFGMS [SEQ ID NO: 36]

LNLMG [SEQ ID NO: 37]

INLLG [SEQ ID NO: 38]

NYWMY; [SEQ ID NO: 39]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con la(s) secuencia(s) de aminoácidos anterior(es);

y en el que:

(v) CDR2 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en

SISGSGSDTLYADSVKG [SEQ ID NO: 40]

TITVGDSTNYADSVKG [SEQ ID NO: 41]

TITVGDSTSYADSVKG [SEQ ID NO: 42]

SINGRGDDTRYADSVKG [SEQ ID NO: 43]

AISADSSTKNYADSVKG [SEQ ID NO: 44]

AISADSSDKRYADSVKG [SEQ ID NO: 45]

RISTGGGYSYYADSVKG [SEQ ID NO: 46]

o del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;

y en el que:

(vi) CDR3 es una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en:

DREAQVDTLDFDY

[SEQ ID NO: 47]

o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores; en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;

o del grupo que consiste en:

GGSLSR [SEQ ID NO: 48]

RRTWHSEL [SEQ ID NO: 49]

GRSVRS [SEQ ID NO: 50]

GRGSP [SEQ ID NO: 51]

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un nanocuerpo contra albúmina sérica humana, que consiste en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), que se elige del grupo que consiste en anticuerpos del dominio y/o anticuerpos de dominio único con una de las siguientes combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente:

**CDR1: SFGMS; CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG; CDR3: GGSLSR;**  
**CDR1: LNLMG; CDR2: TITVGDSTNYADSVKG; CDR3: RRTWHSEL;**  
**CDR1: INLLG; CDR2: TITVGDSTSYADSVKG; CDR3: RRTWHSEL;**  
**CDR1: SFGMS; CDR2: SINGRGDDTRYADSVKG; CDR3: GRSVRS;**  
**CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3: GRGSP;**  
**CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3: GRGSP;**  
**CDR1: NYWMY; CDR2: RISTGGGYSYADSVKG; CDR3:**  
**DREAQVDTLDFDY.**

En los nanocuerpos de la divulgación que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas anteriormente, cada CDR se puede reemplazar por una CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, aún más preferentemente al menos el 99% de identidad de secuencia (tal como se define en el presente documento) con las CDR mencionada(s); en el que

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

5 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores;

10 y/o elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 (tal como se indica en el párrafo precedente) "diferencia(s) de aminoácido" (tal como se define en el presente documento) con las CDR mencionada(s) una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en el que:

(1) cualquier sustitución de aminoácido es preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa (tal como se define en el presente documento); y/o

15 (2) dicha secuencia de aminoácidos preferentemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y no inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos anteriores.

20 Sin embargo, de los nanocuerpos de la divulgación que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas anteriormente, los nanocuerpos que comprenden una o más de las CDR enumeradas anteriormente son particularmente preferidos; los nanocuerpos que comprenden dos o más de las CDR enumeradas anteriormente son más particularmente preferidos; y nanocuerpos que comprenden tres de las CDR enumeradas anteriormente son los más particularmente preferidos.

25 En estos nanocuerpos contra albúmina sérica humana, las regiones de entramado FR1 a FR4 son preferentemente tal como se definieron anteriormente en el presente documento para los nanocuerpos de la invención.

Los nanocuerpos particularmente preferidos contra albúmina sérica humana se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 61 a 67, SEQ ID NO 87 a 89 y SEQ ID NO 100-104. Las combinaciones preferidas de CDR y regiones de entramado presentes en estos nanocuerpos también se enumeran en la tabla II

Tabla II: Combinación preferida de secuencias de entramado y CDR en los nanocuerpos contra albúmina sérica humana.

Clon	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
PMP6A8 (ALB2)	3		3		3		3		3		3		3	
	6	AVQLVESGGGLVQGGG	7		8	WYRQPGN	9	TCIVGDSINYA	9	RFTISMDYKQTVYLHMIN	0		4	WGQGTQV
	8	SLRLACAASERIFD	5	LNLMG	2	ERELVA	8	DSYKG	6	SLRPEDTGLYYCKI	3	RRTWHSEL	0	TVSS
PMP6B4	3		3		3		3		3		3		3	
	6	EVQLVESGGGLVQEGG	7		8	WYRQPGN	9	TITVGDSTSYAD	9	RFTISROYDKNTLYLOMIN	0		4	WGQGTQV
	9	SLRLACAASERIWD	6	INLLG	3	ERELVA	0	SVKG	7	SLRPEDTGLYYCKI	4	RRTWHSEL	1	TVSS
PMP6A6 (ALB1)	3		3		3		3		3		3		3	
	7	AVQLVESGGGLVQPGN	7		8	WVRQAPGK	9	SISGSGSDTYLA	9	RFTISRDNKNTLYLOMIN	0		4	SSQGTQV
	0	SLRLSCAASGFTFR	7	SFGMS	4	EPEWVS	1	DSYKG	8	SLKPEDTAVYYCTI	5	GGSLSR	2	TVSS
PMP6C1	3		3		3		3		3		3		3	
	7	AVQLVDSGGGLVQPGG	7		8	WVRQYPGK	9	SINGRGDDTRYA	9	RFSISRDNKNTLYLOMIN	0		4	RTQGTQV
	1	SLRLSCAASGF5FG	8	SFGMS	5	EPEWVS	2	DSYKG	9	SLKPEDTAEYYCTI	6	GRSVRS	3	TVSS
PMP6G8	3		3		3		3		3		3		3	
	7	AVQLVESGGGLVQPGG	7		8	WVRQAPGK	9	AISADSSTKNYA	9	RFTISRDNKAKMLYLEMIN	0		4	SSPGTQV
	2	SLRLTCTASGFTFR	9	SFGMS	6	DQEWVS	3	DSYKG	0	SLKPEDTAVYYCVI	7	GRGSP	4	TVSS
PMP6A5	3		3		3		3		3		3		3	
	7	QVQLAESGGGLVQPGG	8		8	WVRQAPGE	9	AISAQSSDKRYA	0	RFTISRDNKAKMLYLEMIN	0		4	ASQGTQV
	3	SLRLTCTASGFTFG	0	SFGMS	7	GLEWVS	4	DSYKG	1	SLKSEDVAVYYCVI	8	GRGSP	5	TVSS
PMP6G7	3		3		3		3		3		3		3	
	7	QVQLVESGGGLVQPGG	8		8	WVRVAPGK	9	RDISTGGGYSYY	4	RFTISRDNKNTLYLOMIN	0	DREAQVDTLD	4	RGQGTQV
	4	SLRLSCAASGFTFS	1	NYWMY	8	GLERIS	5	ADSVKG	2	SLKPEDTALYYCAK	9	FDY	6	TVSS

Otro aspecto de la invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones que comprende además al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, un polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma.

5 Según un aspecto de la divulgación, un nanocuerpo está dirigido contra el receptor de TNF-alfa. Dicho nanocuerpo puede ser un  $V_{HH}$  de *Camelidae*.

Según un aspecto de la divulgación, un nanocuerpo está dirigido contra el receptor de IFN-gamma. Dicho nanocuerpo puede ser un  $V_{HH}$  de *Camelidae*.

10 Otro aspecto de la divulgación es un método de tratamiento de una enfermedad o un estado autoinmunitario tal como de cita en el presente documento, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende además al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma, uniéndose tales polipéptidos entre sí tal como se describe a continuación.

15 Tales constructos multiespecíficos pueden tener una potencia mejorada como compuesto terapéutico inflamatorio con respecto a los constructos monoespecíficos.

20 Un aspecto de la invención es una composición que comprende un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto.

25 Un aspecto de la divulgación es un método para tratar la enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de un polipéptido anti-TNF-alfa y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptido anti-IFN-gamma, polipéptido anti-receptor de TNF-alfa y polipéptido anti-receptor de IFN-gamma de forma simultánea, separada o secuencial.

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

35 Por administración simultánea se entiende que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo. Por ejemplo, como una mezcla de polipéptidos o una composición que comprende dichos polipéptidos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación una disolución administrada por vía intravenosa, un comprimido, líquido, crema tópica, etc., en los que cada preparación comprende los polipéptidos de interés.

40 Por administración separada se entiende que los polipéptidos se administran a un sujeto al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo. Los polipéptidos se presentan en el kit como preparaciones no mezcladas separadas. Por ejemplo, los polipéptidos diferentes pueden estar presentes en el kit como comprimidos individuales. Los comprimidos pueden administrarse al sujeto al tragar ambos comprimidos al mismo tiempo, o un comprimido directamente después del otro.

45 Por administración secuencial se entiende que los polipéptidos se administran a un sujeto de forma secuencial. Los polipéptidos se presentan en el kit como preparaciones no mezcladas separadas. Existe un intervalo de tiempo entre las dosis. Por ejemplo, un polipéptido se podría administrar hasta 336, 312, 288, 254, 240, 216, 192, 168, 144, 126, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1 ó 0,5 horas después del otro componente.

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

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

60 Según un aspecto de la divulgación, un polipéptido anti-IFN-gamma, anti-TNF-alfa, un nanocuerpo dirigido contra el gamma-alfa. Dicho nanocuerpo puede ser un  $V_{HH}$  de *Camelidae*.

65 Según un aspecto de la divulgación, anti-TNF-alfa, un nanocuerpo dirigido contra el receptor de TNF-alfa. Dicho nanocuerpo puede ser un  $V_{HH}$  de *Camelidae*.

Según un aspecto de la divulgación, un polipéptido anti-receptor de IFN-gamma, anti-TNF-alfa, un nanocuerpo dirigido contra el receptor de IFN-gamma. Dicho nanocuerpo puede ser un  $V_{HH}$  de *Camelidae*.

5 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones, en el que el número de nanocuerpos dirigidos contra TNF-alfa es dos o más. Tales polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen la ventaja de una afinidad funcional inusualmente alta por la diana, presentando propiedades inhibitorias mucho más altas que las esperadas en comparación con sus homólogos monovalentes.

10 Los polipéptidos anti-TNF-alfa multivalentes tienen afinidades funcionales que son varios órdenes de magnitud más altas de que los polipéptidos anti-TNF-alfa monovalentes originales. Los inventores han hallado que las afinidades funcionales de estos polipéptidos multivalentes son mucho más altas que las notificadas en la técnica anterior para anticuerpos bivalentes y multivalentes. De modo sorprendente, los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención unidos entre sí directamente o por medio de una secuencia de ligador corta muestran las altas afinidades funcionales esperadas teóricamente con los anticuerpos de cuatro cadenas multivalentes convencionales.

15 Los inventores han hallado que tales actividades funcionales muy aumentadas se pueden detectar preferentemente con antígenos compuestos por proteínas multidominio y multiméricas, ya sea en ensayos de unión o ensayos funcionales, por ejemplo ensayos de citotoxicidad.

20 Los nanocuerpos pueden unirse para formar cualquiera de los polipéptidos divulgados en el presente documento que comprenden más de un nanocuerpo usando métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, se pueden fusionar mediante reticulación química haciendo reaccionar residuos de aminoácido con un agente derivatizante orgánico tal como se describe en Blatter *et al*, *Biochemistry* 24,1517-1524; documento EP294703. Alternativamente, el nanocuerpo se puede fusionar genéticamente al nivel del ADN, es decir, un constructo de polinucleótido formado que codifica para el constructo de polipéptido completo que comprende uno o más nanocuerpos anti-diana y uno o más nanocuerpos anti-proteína sérica. Un método para producir constructos de polipéptido de  $V_{HH}$  bivalentes o multivalentes se divulga en la solicitud de patente PCT WO 96/46103. Una manera de unir nanocuerpos múltiples es por medio de la ruta genética uniendo secuencias codificantes del nanocuerpo o bien directamente o bien por medio de un ligador de péptido. Por ejemplo, el extremo C-terminal del primer nanocuerpo puede unirse al extremo N-terminal del próximo nanocuerpo. Este modo de unión se puede extender con el fin de unir nanocuerpos adicionales para la construcción y producción de constructos tri-, tetra-, etc. funcionales.

35 Según un aspecto de la presente invención, los nanocuerpos se unen entre sí directamente sin el uso de un ligador. De forma contraria a la unión de los anticuerpos voluminosos convencionales en la que se necesita una secuencia de ligador para retener la actividad de unión en las dos subunidades, los polipéptidos de la invención se pueden ligar directamente y de este modo evitar los potenciales problemas de la secuencia de ligador, tales como la antigenicidad cuando se administra a un sujeto humano, inestabilidad de la secuencia de ligador que conduce a la disociación de las subunidades.

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

50 Según otro aspecto de la invención, los nanocuerpos multivalentes que comprende más de dos nanocuerpos se pueden unir entre sí o bien directamente o bien por medio de una secuencia de ligador. Tales constructos son difíciles de producir con anticuerpos convencionales y debido al impedimento estático de las subunidades voluminosas, se perderá funcionalidad o disminuirá mucho en vez de aumentar considerablemente tal como se observa con los  $V_{HH}$  de la invención en comparación con el constructo monovalente.

55 Los constructos de polipéptido divulgados en el presente documento pueden producirlos el experto según métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, los  $V_{HH}$  pueden obtenerse usando métodos conocidos en la técnica tales como inmunizando un camello y obteniendo hibridomas de a partir del mismo, o clonando una biblioteca de nanocuerpos usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y posterior selección por usando presentación en fagos.

60 Según un aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se define por las reivindicaciones puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un polipéptido anti-TNF-alfa de longitud completa. Según un aspecto

65

de la invención un polipéptido anti-TNF-alfa puede comprender una secuencia de un polipéptido anti-TNF-alfa.

Según un aspecto de la invención un nanocuerpo usado para formar un polipéptido anti-TNF-alfa puede ser un nanocuerpo completo (por ejemplo, un V<sub>HH</sub>) o una secuencia homóloga del mismo. Según otro aspecto de la invención, un nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de un nanocuerpo completo. Según otro aspecto de la invención, un nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una secuencia homóloga de un nanocuerpo completo. Según otro aspecto de la invención, un nanocuerpo usado para formar el constructo de polipéptido puede ser una porción funcional de una secuencia homóloga de un nanocuerpo completo.

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

Una secuencia homóloga puede ser un polipéptido modificado por la adición, deleción o sustitución de aminoácidos, no alterando sustancialmente dicha modificación las características funcionales en comparación el polipéptido no modificado.

Una secuencia homóloga puede ser un polipéptido modificado por la adición, deleción o sustitución de aminoácidos no alterando sustancialmente dicha modificación las características funcionales en comparación el polipéptido no modificado.

Una secuencia homóloga puede ser una secuencia que existe en otras especies de *Camelidae* tales como, por ejemplo, camello, dromedario, llama, alpaca, guanaco etc.

Cuando la secuencia homóloga indica identidad de secuencia, significa una secuencia que presenta una alta identidad de secuencia (más del 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 98% de identidad de secuencia) con secuencia original y preferentemente se caracteriza por propiedades similares de la secuencia original, a saber afinidad, dicha identidad se calcula mediante métodos conocidos.

Alternativamente, una secuencia homóloga también puede ser cualquier secuencia de aminoácidos resultante de las sustituciones permitidas en cualquier número de posiciones de la secuencia original según la siguiente fórmula:

Ser sustituida por Ser, Thr, Gly y Asn;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp sustituida por uno de Asp, Glu y Asn;

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

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

Una secuencia homóloga de nucleótidos se puede referir a las secuencias de nucleótidos de más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ó 1000 nucleótidos capaces de hibridar al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos capaz de codificar para la secuencia original, en condiciones de hibridación rigurosas (tales como las descritas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory press, Nueva York).

Tal como se usa en el presente documento, una porción funcional se refiere a una secuencia de un nanocuerpo que es tamaño suficiente de modo que se mantiene la interacción de interés con una afinidad de  $1 \times 10^{-6}$  M o mejor.

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

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

25 Las dianas tal como se mencionan en el presente documento tales como TNF-alfa, receptor de TNF-alfa, proteínas séricas (por ejemplo, albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina, fibrinógeno) e IFN-gamma, receptor de IFN-gamma pueden ser fragmentos de dichas dianas. En consecuencia una diana también es un fragmento de dicha diana, capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Una diana también es un fragmento de dicha diana, capaz de unirse a un nanocuerpo producido contra la diana de longitud completa.

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

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

40 Una secuencia homóloga puede incluir un polipéptido anti-TNF-alfa que se ha humanizado. La humanización de los anticuerpos de la nueva clase de  $V_{HH}$  también reduce la posibilidad de reacción inmunológica no deseada en un individuo humano después de la administración.

45 Una realización de la presente divulgación se refiere a un método para preparar polipéptidos modificados basándose en anticuerpos de llama determinando los residuos de aminoácido del dominio variable del anticuerpo ( $V_{HH}$ ) que se pueden modificar sin disminuir la afinidad nativa del dominio por el antígeno y reducir a la vez su inmunogenicidad con respecto a una especie heteróloga; el uso de los  $V_{HH}$  que tienen modificaciones en los residuos identificados que son útiles para la administración a especies heterólogas; y al  $V_{HH}$  así modificado.

50 Más específicamente, la divulgación se refiere a la preparación de  $V_{HH}$  modificados, que se modifican para la administración a los humanos, los  $V_{HH}$  resultantes mismos y el uso de tales  $V_{HH}$  "humanizados" en el tratamiento de enfermedades en los humanos. Por humanizado se entiende mutado de modo que la inmunogenicidad después de la administración en pacientes humanos sea menor o inexistente. La humanización de un polipéptido comprende una etapa de reemplazar uno o más de los aminoácidos de *Camelidae* por su homólogo humano tal como se halla en la secuencia consenso humana, sin que el polipéptido pierda su carácter típico, es decir la humanización no afecta significativamente a la capacidad de unión del antígeno del polipéptido resultante. Tales métodos los conoce el destinatario experto.

60 La humanización de los nanocuerpos de *Camelidae* requiere la introducción y mutagénesis de una cantidad limitada de aminoácidos en una única cadena de polipéptido. Esto contrasta con la humanización de scFv, Fab, (Fab)<sub>2</sub> e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en las dos cadenas, la cadena ligera y la cadena pesada y la conservación del ensamblaje de ambas cadenas.

65 Tal como se describe en el documento WO 04/041862, un nanocuerpo anti-TNF se puede humanizar. La humanización por ejemplo puede implicar la mutagénesis de residuos en FR1 en las posiciones 1 y 5 que se introdujeron por el



5 cebador usado para la clonación del repertorio y no se produce de manera natural en la secuencia de llama. La mutagénesis de estos residuos no dio como resultado una pérdida de actividad de unión y/o inhibición. La humanización también puede implicar la mutagénesis de residuos en FR3 en las posiciones 74, 76, 83, 84, 93. La mutagénesis de esos residuos no dio como resultado una pérdida drástica de actividad de unión y/o inhibición. La combinación de las mutaciones de FR1 y FR3 por ende no afectaron a la actividad de unión y/o inhibición. La humanización también puede implicar la mutagénesis de residuos en FR4 en la posición 108. La mutagénesis de Q108L dio como resultado un menor nivel de producción en *Escherichia coli*. La posición 108 está expuesta al disolvente en el V<sub>HH</sub> de camélido, mientras que en los anticuerpos humanos esta posición está sepultada en la superficie de contacto V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). En los V<sub>H</sub> aislados, la posición 108 está expuesta al disolvente. La introducción de una Leu hidrófoba apolar en vez de Gln polar no cargada puede tener un efecto drástico sobre el plegamiento/estabilidad intrínsecos de la molécula. Asimismo, el reemplazo de los residuos hidrófilos por residuos hidrófobos humanos en las posiciones 44 y 45 (E44G y R45L), no tuvo efecto sobre la unión y/o inhibición. Sin embargo, se observó pérdida de actividad de unión y/o inhibición cuando se introdujeron F37V y F47W. Los datos de modelado confirmaron el residuo crítico 37 para conservar la integridad de la conformación del bucle de CDR3 y en consecuencia sobre la actividad (toda la numeración según Kabat).

Según una realización de la presente invención, la humanización implica el reemplazo de alguno de los siguientes residuos solos o en combinación:

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

30 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa, o un ácido nucleico capaz de codificar para dicho polipéptido para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos relacionados con procesos inflamatorios. TNF-alfa está implicado en los procesos inflamatorios, y el bloqueo de la acción de TNF-alfa puede tener un efecto antiinflamatorio, que es muy deseado en ciertos estados patológicos tales como, por ejemplo, enfermedad de Crohn. Los ejemplos demuestran V<sub>HH</sub> según la invención que se unen a TNF-alfa y además, bloquean su unión al receptor de TNF-alfa.

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

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

50 Los estados autoinmunitarios para los que los polipéptidos anti-TNF-alfa de la presente invención se pueden aplicar incluyen, por ejemplo, SIDA, alergia atópica, asma bronquial, eccema, lepra, esquizofrenia, depresión hereditaria, trasplante de tejidos y órganos, síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, autismo, epilepsia, fenómeno de Arthus, anafilaxia y adicción a alcohol y fármacos. En los estados autoinmunitarios identificados anteriormente, el tejido afectado es la diana primaria, en otros casos es la diana secundaria. Estos estados son en parte o principalmente síndromes autoinmunitarios. En consecuencia, para tratarlos, es posible usar los mismos métodos, o aspectos de los mismos métodos que se divulgan en el presente documento, algunas veces en combinación con otros métodos.

60 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa según la invención, o un ácido nucleico capaz de codificar para dicho polipéptido para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con los procesos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal y esclerosis múltiple.

65 Los polipéptidos y ácidos nucleicos según la presente invención pueden administrarse a un sujeto por vías convencionales, tal como vía intravenosa. Sin embargo, una propiedad especial de los polipéptidos anti-TNF-alfa de

la invención es que penetran barreras tales como membranas tisulares y/o tumores y actúan localmente en los mismos y son suficientemente estables para resistir los entornos extremos tales como en el estómago. En consecuencia, otro aspecto de la presente invención se refiere a la administración de polipéptidos anti-TNF-alfa.

5 Cuando los nanocuerpos y/o polipéptidos de la invención se usan para, o están destinados al uso para la prevención o el tratamiento de enfermedades y trastornos del aparato gastrointestinal, en particular por medio de administración oral u otra administración en el aparato gastrointestinal, habitualmente no será necesario usar polipéptidos de la invención que tengan aumento de la semivida en suero (es decir, que se han pegilado o que contienen un nanocuerpo dirigido contra una proteína sérica). En consecuencia, para tales indicaciones, pueden usarse polipéptidos de la invención que solo contienen nanocuerpos de la invención. En particular, se ha hallado que en la administración oral para la prevención y el tratamiento de enfermedades o trastornos del aparato gastrointestinal asociados con y/o mediados por TNF-alfa (tales como EII y las otras enfermedades y trastornos del aparato gastrointestinal mencionados anteriormente), se puede preferir el uso de un nanocuerpo monovalente de la invención o de un polipéptido de la invención que consiste esencialmente en un nanocuerpo monovalente de la invención. Para otras indicaciones, tales como el tratamiento de artritis reumatoide (AR), se puede preferir el uso de un nanocuerpo bivalente de la invención. Cuando tal nanocuerpo debe alcanzar su sitio de acción pretendido por medio del torrente sanguíneo, se puede preferir el uso de un polipéptido de la invención que tiene un aumento de semivida en el suero.

20 Un sujeto según la invención puede ser cualquier mamífero susceptible de tratamiento con polipéptidos terapéuticos.

La administración oral de los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención da como resultado la provisión de tales moléculas en una forma activa en el colon en los sitios locales que se ven afectados por el trastorno. Estos sitios pueden estar muy inflamados y contener células productoras de TNF-alfa. Los polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención que se unen a TNF-alfa pueden neutralizar el TNF-alfa de forma local, evitando la distribución a lo largo del cuerpo completo y de este modo se limitan los efectos secundarios negativos. Los microorganismos genéticamente modificados tales como *Micrococcus lactis* son capaces de secretar el anticuerpo o porciones funcionales del mismo. Tales microorganismos modificados pueden usarse como vehículos para la producción local y administración de anticuerpos o porciones funcionales de los mismos en el intestino. Usando una cepa que produce un polipéptido anti-TNF-alfa, se puede tratar el síndrome inflamatorio intestinal.

30 Otro aspecto de la invención implica la administración de polipéptidos anti-TNF usando la expresión en superficie o la secreción de bacterias no invasivas, tales como organismos huésped Gram-positivos como *Lactococcus spec.* usando un vector tal como se describe en el documento WO 00/23471.

35 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el entorno gástrico sin que se inactive la sustancia.

40 Los ejemplos de trastornos son cualquiera que provoque inflamación, incluyendo pero sin limitarse a, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal y esclerosis múltiple. Tal como conocen los expertos en la técnica, una vez en posesión de dicho constructo de polipéptido, se puede aplicar la tecnología de formulación para liberar una cantidad máxima de polipéptido en la ubicación correcta (en el estómago, en el colon, etc.). Este método de administración es importante para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos cuyas dianas se ubican en el sistema intestinal.

50 Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno susceptible de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el entorno gástrico sin inactivarse, administrando de forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF alfa tal como se divulga en el presente documento.

Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar el entorno gástrico sin inactivarse.

60 Un aspecto de la invención es un método para administrar un nanocuerpo o polipéptido de la invención en el sistema intestinal sin que dicha sustancia se inactive, administrando de forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

Un aspecto de la invención es un método para administrar un nanocuerpo o polipéptido de la invención en el torrente sanguíneo de un sujeto sin que se inactive la sustancia, administrando de forma oral a un sujeto un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento.

65 Otra realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas o trastornos susceptibles de modulación por

un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

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

10 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en el tracto vaginal y/o rectal.

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

20 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la nariz, vías respiratorias altas y/o pulmón, sin que dicho polipéptido se inactive.

25 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal. Debido a su tamaño pequeño, un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento puede atravesar la mucosa intestinal y alcanzar el torrente sanguíneo más eficientemente en sujetos que padecen trastornos que provocan un aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal, por ejemplo enfermedad de Crohn.

35 Este proceso aún se puede mejorar aún adicionalmente mediante el uso de portadores de transporte activos. En este aspecto de la invención,  $V_{HH}$  se fusiona a un portador que aumenta la transferencia a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo. En un ejemplo no limitativo, este "portador" es un segundo  $V_{HH}$  que se fusiona al  $V_{HH}$  terapéutico. Tales constructos de fusión se producen usando métodos conocidos en la técnica. El " $V_{HH}$  portador" se une específicamente a un receptor de la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

40 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir o y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención administrado en la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

45 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua de forma eficaz.

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

55 Otra realización de la presente invención es un uso de un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar los tejidos debajo de la lengua de forma eficaz.

60 Una realización de la presente invención es un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel de forma eficaz.

65 Los ejemplos de trastornos son cualquiera que provoque inflamación, incluyendo pero sin limitarse artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal y esclerosis múltiple. Una formulación de dicho

constructo de polipéptido, por ejemplo, una crema, película, pulverización, gota, parche se coloca en la piel y la atraviesa.

5 Otra realización de la presente invención es un uso de polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación por un nanocuerpo o polipéptido de la invención que es capaz de atravesar la piel de forma eficaz.

10 En otra realización de la presente divulgación, un polipéptido anti-TNF-alfa comprende además un nanocuerpo portador (por ejemplo,  $V_{HH}$ ) que actúa como portador de transporte activo para el transporte de dicho polipéptido anti-TNF-alfa, desde la luz pulmonar hasta la sangre.

15 Un polipéptido anti-TNF-alfa que comprende además un portador que se une específicamente a un receptor presente en la superficie mucosa (células epiteliales bronquiales) que da como resultado el transporte activo del polipéptido desde la luz pulmonar hasta la sangre. El nanocuerpo portador se puede fusionar al constructo de polipéptido. Tales constructos de fusión pueden producirse mediante métodos conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. El nanocuerpo "portador" se une específicamente a un receptor sobre la superficie mucosa que induce una transferencia activa a través de la superficie.

20 Otro aspecto de la presente divulgación es un método para determinar qué nanocuerpos (por ejemplo,  $V_{HH}$ ) se transportan activamente al torrente sanguíneo después de la administración nasal. De modo similar, una biblioteca de fagos de  $V_{HH}$  inactivos o inmunitarios puede administrarse por vía nasal y después de diferentes puntos de tiempo después de la administración, se pueden aislar sangre u órganos para rescatar los fagos que se han transportado activamente al torrente sanguíneo. Un ejemplo no limitativo de un receptor para el transporte activo desde la luz pulmonar hasta el torrente sanguíneo es el receptor de Fc (FcRn). Un aspecto de la invención incluye las moléculas de  $V_{HH}$  identificadas por el método. Tal  $V_{HH}$  posteriormente puede usarse como un  $V_{HH}$  portador para la administración de un  $V_{HH}$  terapéutico a la correspondiente diana en el torrente sanguíneo después de la administración nasal.

30 En un aspecto de la divulgación, puede usarse un polipéptido anti-TNF-alfa tal como se divulga en el presente documento, con el fin de detectar agentes que modulen la unión del polipéptido a TNF-alfa. Cuando se identifican en un ensayo que mide la unión o dicho desplazamiento del polipéptido solo, los agentes deberán someterse a pruebas funcionales para determinar si pueden modular la acción del antígeno *in vivo*.

35 En un ejemplo de un experimento de desplazamiento, el fago o las células que expresan TNF-alfa o un fragmento del mismo se incuban en tampón de unión con el polipéptido de la invención que se ha marcado, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un modulador candidato. Para validar y calibrar el ensayo, se pueden realizar reacciones de competencia de control que usan concentraciones crecientes de dicho polipéptido y que está sin marcar. Después de la incubación, las células se lavan extensamente, y se mide el polipéptido marcado unido según sea apropiado para el marcador determinado (por ejemplo, contador de centelleo, fluorescencia, etc.). Una disminución de al menos el 10% de la cantidad de polipéptido marcado unido en presencia de modulador candidato indica el desplazamiento de la unión por parte del modulador candidato. Se consideran que los moduladores candidatos se unen específicamente en este u otros ensayos descritos en el presente documento si desplazan el 50% del polipéptido marcado (dosis de subsaturación del polipéptido) a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  o menos.

45 Alternativamente, la unión o el desplazamiento de unión puede monitorizarse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Los ensayos de resonancia de plasmón superficial pueden usarse como método cuantitativo para medir la unión entre dos moléculas por el cambio de masa cerca de sensor inmovilizado provocado por la unión o pérdida de unión del polipéptido de la invención de la fase acuosa al TNF-alfa inmovilizado en una membrana sobre el sensor. Este cambio de masa se mide como unidades de resonancia frente a tiempo después de la inyección o retirada de dicho polipéptido o modulador candidato y se mide mediante un biosensor Biacore (Biacore AB). TNF-alfa se puede inmovilizar, por ejemplo en un chip sensor (por ejemplo, chip CM5 de grado de investigación; Biacore AB) en una membrana lipídica delgada según métodos descritos por Salamon *et al.* (Salamon *et al.*, 1996, Biophys J. 71: 283-294; Salamon *et al.*, 2001, Biophys. J. 80: 1557-1567; Salamon *et al.*, 1999, Trends Biochem. Sci. 24: 213-219, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia). Sarrío *et al.* demostraron que la SPR puede usarse para detectar la unión del ligando al receptor de adenosina GPCR A(1) inmovilizado en una capa lipídica en el chip (Sarno *et al.*, 2000, Mol. Cell. Biol. 20: 5164-5174, incorporado en el presente documento como referencia). Las condiciones para la unión de un polipéptido de la invención al TNF-alfa en un ensayo SPR pueden ajustarse el experto en la técnica usando las condiciones notificadas por Sarrío *et al.* como punto de partida.

60 El SPR puede someter a ensayo moduladores de unión de al menos dos maneras. En primer lugar, un polipéptido de la invención se puede unir previamente al TNF-alfa inmovilizado seguido por la inyección de un modulador candidato a una concentración que oscila desde 0,1 nM hasta 1  $\mu\text{M}$ . El desplazamiento del polipéptido unido se puede cuantificar, lo que permite la detección de la unión del modulador. Alternativamente, el TNF-alfa unido a membrana se puede preincubar con un modulador candidato y exponerse al polipéptido de la invención. Una diferencia en la afinidad de unión entre dicho polipéptido y el TNF-alfa preincubado con el modulador, en comparación con la afinidad entre dicho polipéptido y TNF-alfa en ausencia del modulador demostrará la unión o el desplazamiento de dicho polipéptido en

presencia del modulador. En cualquier ensayo, una disminución del 10% o más en la cantidad de dicho polipéptido unido en presencia del modulador candidato, con relación a la cantidad de dicho polipéptido unido en ausencia del modulador candidato indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y dicho polipéptido.

5 Otro método de detección de la inhibición de unión de, por ejemplo, un polipéptido de la invención, a TNF-alfa usa la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un fenómeno de mecánica cuántica que se produce entre un dador de fluorescencia (D) y un aceptor de fluorescencia (A) en estrecha proximidad entre sí (habitualmente < 100 Å de separación) si el espectro de emisión de D se solapa con el espectro de excitación de A. Las moléculas que van a someterse a prueba, por ejemplo un polipéptido de la invención y un TNF-alfa se marcan con un par complementario de fluoróforos dador y aceptor. Mientras que están unidos estrechamente por la interacción TNF-alfa:polipéptido, la fluorescencia emitida después de la excitación del fluoróforo dador tendrá una longitud de onda diferente que la emitida en respuesta a la longitud de onda de excitación cuando dicho polipéptido y TNF-alfa no están unidos, lo que proporciona la cuantificación de las moléculas unidas frente a no unidas por la medición de la intensidad de emisión a cada longitud de onda. Los fluoróforos dadores con los que se marcan el TNF-alfa se conocen bien en la técnica. De particular interés son las variantes de A. GFP Victoria conocida como FP cian (CEP, dador (D)) y FP amarilla (YFP, aceptor (A)). A modo de ejemplo, la variante YFP puede producirse como una proteína de fusión con TNF-alfa. Los vectores para la expresión de las variantes de GFP como fusiones (Clontech) así como los reactivos marcados con fluoróforo (Molecular Probes) se conocen en la técnica. La adición de un modulador candidato a la mezcla de polipéptido marcado con fluorescencia y YFP-TNF-alfa dará como resultado una inhibición de la transferencia de energía evidenciada, por ejemplo, por una disminución de la fluorescencia de YFP con respecto a una muestra sin el modulador candidato. En un ensayo que usa FRET para la detección de la interacción TNF-alfa:polipéptido, una disminución del 10% o mayor de la intensidad de emisión de fluorescencia a la longitud de onda del aceptor en las muestras que contienen un modulador candidato, con relación a las muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción TNF-alfa:polipéptido.

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

Una variación de FRET usa la extinción de la fluorescencia para monitorizar interacciones moleculares. Una molécula del par de interacción se puede marcar con un fluoróforo, y la otra con una molécula que extingue la fluorescencia del fluoróforo cuando se pone en estrecha aposición con el mismo. Un cambio de fluorescencia después de la excitación es indicativo de un cambio en la asociación de las moléculas marcadas con etiqueta con el par fluoróforo:extintor. Generalmente, un aumento de la fluorescencia del TNF-alfa marcado es indicativo que el polipéptido anti-TNF-alfa que porta el extintor se ha desplazado. En los ensayos de extinción, un aumento del 10% o mayor en la intensidad de la emisión fluorescente en las muestras que contienen un modulador candidato, con relación a las muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa.

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

55 Otra alternativa para monitorizar las interacciones TNF-alfa:polipéptido anti-TNF-alfa usa un ensayo de biosensor. Los biosensores ICS se han descrito en la técnica (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; Cornell Li, Braach-Maksvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wiczorek I y Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" Nature 1997, 187, 580). En esta tecnología, la asociación de TNF-alfa y un polipéptido anti-TNF-alfa se acopla al cierre de los canales iónicos facilitados por gramicidina en bicapas de membranas en suspensión y en consecuencia a un cambio medible en la admitancia (similar a la impedancia) del biosensor. Este método es lineal a lo largo de seis órdenes de magnitud de cambio de admitancia y es adecuado idealmente para la detección de alto rendimiento a gran escala de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Un cambio del 10% o mayor (aumento o disminución) en la admitancia en una muestra que contiene un modulador candidato, con relación a la admitancia de una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de TNF-alfa y dicho polipéptido. Es importante indicar que en los ensayos que someten a prueba la interacción de TNF-alfa con un polipéptido anti-TNF-alfa, es posible que un modulador de la interacción no tenga necesariamente que interaccionar de forma directa con el/los dominio(s) de las proteínas que interacciona(n) físicamente con dicho polipéptido. También

es posible que un modulador interaccione en una ubicación retirada del sitio de interacción y provoque, por ejemplo, un cambio conformacional del TNF-alfa. Los moduladores (inhibidores o agonistas) que actúan de esta manera, sin embargo son de interés como agentes para modular la unión de TNF-alfa a su receptor.

5 Cualquiera de los ensayos de unión puede usarse para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que se une a TNF-alfa, o que afecta a la unión de, por ejemplo, un polipéptido de la invención al TNF-alfa. Para realizar esto, un TNF-alfa se hace reaccionar con dicho polipéptido en presencia o ausencia de la muestra, y se mide la unión del polipéptido según sea apropiado para el ensayo de unión que esté usándose. Una disminución del 10% o más en la unión de dicho polipéptido indica que la muestra contiene un agente que modula la unión de dicho polipéptido al TNF-alfa. Obviamente, el método generalizado anteriormente se podría aplicar fácilmente a la detección de moduladores candidatos que alteran la unión entre cualquier polipéptido anti-TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo, una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo y TNF-alfa o un fragmento del mismo.

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

20 Una célula que es útil según la invención puede ser cualquier célula tal como se define en las reivindicaciones en la que se puede introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende un anti-TNF-alfa de la invención, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo de modo que el polipéptido se exprese en niveles naturales o por encima de los niveles naturales, tal como se define en el presente documento. Preferentemente un polipéptido de la invención que se expresa en una célula presenta farmacología normal o cerca de lo normal, tal como se define en el presente documento.

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

30 En general, "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" significa la cantidad necesaria para obtener el resultado o resultados deseados (modulación de la unión de TNF-alfa; tratamiento o prevención de la inflamación). Un experto en la técnica reconocerá que la potencia y en consecuencia, una "cantidad eficaz" puede variar para los diversos compuestos que modulan la unión a TNF-alfa usados en la invención. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia del compuesto.

35 Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo no deseado, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el compuesto sin provocar ningún efecto biológico no deseado o interactuar de manera perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en el que está contenido.

Los polipéptidos anti-TNF-alfa tal como se divulgan en el presente documento son útiles para tratar o prevenir estados en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o una composición.

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

50 Los polipéptidos anti-TNF-alfa tal como se divulgan en el presente documento son útiles para tratar o prevenir estados en un sujeto y comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación del compuesto con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

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

60 Los comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas, y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma tragacanto, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente aromatizante tal como menta piperita, aceite de gaulteria o aromatizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos,

65

5 pastillas o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Obviamente, cualquier material usado para preparar cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

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

15 Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para la inyección o infusión pueden incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que se adaptan para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables o infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación última debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede producirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Se preparan disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros principios enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier principio deseado adicional presente en las disoluciones filtradas de forma estéril previamente.

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

40 Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxiaquillos o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que el presente compuesto se puede disolver o dispersar en niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar en parches absorbentes, usados para impregnar vendas y otros apósitos o pulverizar sobre el área afectada mediante el uso de pulverizadores de tipo bomba o aerosol.

50 También se pueden emplear espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácido graso, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con portadores líquidos para formar pastas untables, geles, pomadas, jabones y similares, para la aplicación directa en la piel del usuario.

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

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

65 Generalmente, la concentración del/de los compuesto(s) en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5-10% en peso. La concentración de una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5% en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5-2,5% en peso.

La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, necesaria para su uso en tratamiento variará no

solo con la sal particular seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que se trata y la edad y el estado del paciente y finalmente será según el criterio del médico o clínico asistente. Asimismo la dosificación del compuesto varía según la célula, el tumor, tejido, injerto u órgano.

5 La dosis deseada se puede presentar de modo conveniente en una dosis única o como dosis divididas administradas en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis también se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones diferenciadas libremente espaciadas; tales como múltiples inhalaciones de un insuflador o mediante aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

10 Un régimen de administración puede incluir tratamiento diario a largo plazo. Por "largo plazo" se entiende al menos dos semanas y preferentemente, varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación puede determinarlas un experto en la técnica usando solo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ajustarla el médico de forma individual en el caso de alguna complicación.

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

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

25 Se pueden seleccionar agentes moduladores candidatos de bibliotecas grandes de agentes sintéticos o naturales. Actualmente se usan numerosos medios para la síntesis al azar y dirigida de agentes basados en sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos. Las bibliotecas de agentes sintéticos están disponibles comercialmente de varias compañías incluyendo Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, R.U.), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH) y Microsource (New Milford, CT). Una biblioteca de productos químicos raros está disponible de Aldrich (Milwaukee, WI). Las bibliotecas combinatorias están disponibles y se pueden preparar. Alternativamente, las bibliotecas de agentes naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de plantas y animales están disponibles, por ejemplo, de Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o pueden producirse fácilmente mediante métodos bien conocidos en la técnica. De forma adicional, las bibliotecas y agentes naturales y producidos de forma sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

35 Se pueden hallar agentes útiles en numerosas clases químicas. Los agentes útiles pueden ser agentes orgánicos, o agentes orgánicos pequeños. Los agentes orgánicos pequeños tienen un peso molecular de más de 50, aunque de menos de aproximadamente 2.500 Dalton, preferentemente menos de aproximadamente 750, más preferentemente menos de aproximadamente 350 Dalton. Las clases a modo de ejemplo incluyen heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides, y similares. Los agentes se pueden modificar para aumentar la eficacia, estabilidad, compatibilidad farmacéutica, y similares. La identificación estructural de un agente puede usarse para identificar, generar o detectar agentes adicionales. Por ejemplo, cuando se identifican agentes peptídicos, se pueden modificar de una variedad de maneras para aumentar su estabilidad, tal como el uso de un aminoácido no natural, tal como un D-aminoácido, particularmente D-alanina, mediante la funcionalización del extremo terminal amino o carboxílico, por ejemplo para el grupo amino, acilación o alquilación, y para el grupo carboxilo, esterificación o amidación, o similares.

45 Para la detección primaria, una concentración útil de un agente candidato según la invención es de desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100  $\mu$ M o más (es decir, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M etc.). La concentración de detección primaria se usará como límite superior, junto con nueve concentraciones adicionales, en las que se determinan las concentraciones adicionales mediante la reducción de la concentración de detección primaria en intervalos semilogarítmicos (por ejemplo, para 9 concentraciones más) para detecciones secundarias o para generar curvas de concentración.

50 Un kit de detección de alto rendimiento según la invención comprende todos los medios necesarios y medios para realizar la detección de un agente que modula las interacciones TNF-alfa/receptor de TNF-alfa mediante la interacción con TNF-alfa en presencia de un polipéptido, preferentemente a una concentración en el intervalo de 1  $\mu$ M a 1 M.

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

65 Los agentes moduladores según la invención, a concentraciones de aproximadamente 1  $\mu$ M a 1 mM o más, se añaden a pocillos definidos en presencia de una concentración apropiada del polipéptido anti-TNF-alfa, una secuencia homóloga del mismo, una porción funcional del mismo o una porción funcional de una secuencia homóloga del mismo,



dicha concentración de dicho polipéptido preferentemente en el intervalo de 1  $\mu$ M a 1 mM. Los kits pueden contener uno o más polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención.

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

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

15 Además, quedará claro para el experto que puede ser posible "injertar" una o más de las CDR mencionadas anteriormente para los nanocuerpos de la invención sobre otros "andamiajes", incluyendo, pero sin limitarse a, andamiajes humanos o andamiajes distintos de inmunoglobulina. Los andamiajes adecuados y las técnicas para tal injerto de CDR quedarán claros para el experto y se conocen en la técnica, véanse por ejemplo los documentos US-A-7,180,370, WO 01/27160, EP 0 605 522, EP 0 460 167, US-A-7,054,297, Nicaise *et al.*, Protein Science (2004), 13:1882-1891; Ewert *et al.*, Methods, octubre de 2004; 34(2):184-199; Kettleborough *et al.*, Protein Eng. octubre de 1991; 4(7): 773-783; O'Brien y Jones, Métodos Mol. Biol. 2003: 207: 81-100; y Skerra, J. Mol. Recognit. 2000: 13: 167-187, y Saerens *et al.*, J. Mol. Biol. septiembre de 2005 23:352(3):597-607, y las referencias adicionales citadas en esos documentos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas conocidas *per se* para el injerto de CDR de ratón o rata sobre regiones de entramado y andamiajes humanos, de manera análoga para proporcionar proteínas quiméricas que comprenden una o más de las CDR de los nanocuerpos de la invención y una o más secuencias o regiones de entramado humanas.

20 Por tanto, en otra realización, la divulgación comprende un polipéptido quimérico que comprende al menos una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de CDR1, secuencias de CDR2 y secuencias de CDR3 mencionadas en el presente documento para los nanocuerpos de la invención. Preferentemente, un polipéptido quimérico de este tipo comprende al menos una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 mencionadas en el presente documento para los nanocuerpos de la invención, y opcionalmente también al menos una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y secuencias de CDR2 mencionadas en el presente documento para los nanocuerpos de la invención. Por ejemplo, polipéptido quimérico de este tipo puede comprender una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 mencionadas en el presente documento para los nanocuerpos de la invención, una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 mencionadas en el presente documento para los nanocuerpos de la invención y una secuencia de CDR elegida del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y secuencias de CDR2 mencionadas en el presente documento para los nanocuerpos de la invención. Las combinaciones de CDR que se mencionan en el presente documento como preferidas para los nanocuerpos de la invención también se preferirán habitualmente para estos polipéptidos quiméricos.

25 En dichos polipéptidos quiméricos, las CDR pueden unirse a secuencias de aminoácidos adicionales y/o pueden unirse entre sí por medio de secuencias de aminoácidos, en las que dichas secuencias de aminoácidos son preferentemente secuencias de entramado o son secuencias de aminoácidos que actúan como secuencias de entramado, o forman juntas un andamiaje para presentar las CDR. Se hace referencia de nuevo a la técnica anterior mencionada en el último párrafo. Según una realización preferida, las secuencias de aminoácidos son secuencias de entramado humanas, por ejemplo secuencias de entramado de VH3. Sin embargo, también pueden usarse secuencias de entramado no humanas, sintéticas, semi sintéticas o distintas de inmunoglobulina. Preferentemente, las secuencias de entramado usadas son tales que (1) el polipéptido quimérico capaz de unirse a xxx, es decir con una afinidad que es al menos del 1%, preferentemente al menos el 5%, más preferentemente al menos el 10%, tal como al menos el 25% y hasta el 50% o el 90% o más de la afinidad del nanocuerpo de la invención correspondiente; (2) el polipéptido quimérico es adecuado para uso farmacéutico; y (3) el polipéptido quimérico es preferentemente no inmunogénico esencialmente en las condiciones pretendidas para uso farmacéutico (es decir indicación, modo de administración,

dosis y régimen de tratamiento) del mismo (que pueden ser esencialmente análogas a las condiciones descritas en el presente documento para el uso de los nanocuerpos de la invención).

5 Según una realización no limitativa, el polipéptido quimérico comprende al menos dos secuencias de CDR (tal como se mencionó anteriormente) unidas por al menos una secuencia de entramado, en el que preferentemente al menos una de las dos secuencias de CDR es una secuencia de CDR3, siendo la otra secuencia de CDR una secuencia de CDR1 o CDR2. Según una realización preferida, pero no limitativa, el polipéptido quimérico comprende al menos dos secuencias de CDR (tal como se mencionó anteriormente) unidas a al menos dos secuencias de entramado, en el que preferentemente al menos una de las tres secuencias de CDR es una secuencia de CDR3, siendo las otras dos secuencias de CDR secuencias de CDR1 o CDR2, y siendo preferentemente una secuencia de CDR1 y una secuencia de CDR2. Según una realización específicamente preferida, pero no limitativa, los polipéptidos quiméricos tienen la estructura FR1' - CDR1 - FR2' - CDR2 - FR3' - CDR3 - FR4', en la que CDR1, CDR2 y CDR3 son tal como se definen en el presente documento para las CDR de los nanocuerpos de la invención, y FR1', FR2', FR3' y FR4' son secuencias de entramado. FR1', FR2', FR3' y FR4' pueden ser en particular la secuencia de entramado 1, la secuencia de entramado 2, la secuencia de entramado 3 y la secuencia de entramado 4, respectivamente, de un anticuerpo humano (tales como secuencias de VH3) y/o partes o fragmentos de tales secuencias de entramado. También es posible usar partes o fragmentos de un polipéptido quimérico con la estructura FR1' - CDR1 - FR2' - CDR2 - FR3' - CDR3 - FR4'. Preferentemente, tales partes o fragmentos son tales que cumplen los criterios expuestos en el párrafo anterior.

20 La divulgación también se refiere a proteínas y polipéptidos que comprenden y/o esencialmente consisten en tales polipéptido quiméricos, a ácidos nucleicos que codifican para tales proteínas o polipéptidos; a métodos para preparar tales proteínas y polipéptidos; a células huésped que expresan o capaces de expresar tales proteínas o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales proteínas o polipéptidos, ácidos nucleicos o células huésped; y a usos de tales proteínas o polipéptidos, tales ácidos nucleicos, tales células huésped y/o tales composiciones, en particular con propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, tales como los propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico mencionados en el presente documento. Por ejemplo, tales proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, métodos, células huésped, composiciones y usos pueden ser análogos a las proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, métodos, células huésped, composiciones y usos descritos en el presente documento para los nanocuerpos de la invención.

30 La invención se describirá a continuación por medio de los siguientes ejemplos y figuras no limitativos, en los que las figuras muestran:

#### Nanocuerpos de TNF- $\alpha$ monovalentes

35 Figura 1: Alineación de secuencias de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanos

Figura 2: Alineación de secuencias de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  específicos para albúmina sérica

40 Figura 3: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  específicos para albúmina sérica contra albúmina sérica humana

Figura 4: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  específicos para albúmina sérica contra albúmina sérica de rhesus

45 Figura 5: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  específicos para albúmina sérica contra albúmina sérica de ratón

Figura 6: Pureza de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$  (SDS-PAGE)

Figura 7: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$

50 Figura 8: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  a TNF- $\alpha$  humano (ELISA)

Figura 9: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  a TNF- $\alpha$  de rhesus (ELISA)

55 Figura 10: Ensayo de inhibición del receptor en Enbrel para TNF- $\alpha$  humano

Figura 11: Ensayo de inhibición del receptor en Enbrel para TNF- $\alpha$  de rhesus

Figura 12: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  a TNF- $\alpha$  humano (Biacore)

60 Figura 13: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  a TNF- $\alpha$  de rhesus (Biacore)

Figura 14: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  a la proteína A (Biacore)

65 Figura 15: Tratamiento de temperatura de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$  (inmunotransferencia de tipo Western)

Figura 16: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  (ELISA)

Figura 17: Tratamiento de temperatura de nanocuerpos de albúmina sérica (Biacore)

5

Nanocuerpos de TNF- $\alpha$  bivalentes

Figura 18: Pureza de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  bivalentes (SDS-PAGE)

10 Figura 19: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  bivalentes

Figura 20: Ensayo de inhibición del receptor en Enbrel para nanocuerpos de TNF- $\alpha$  bivalentes

Figura 21: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  bivalentes (ELISA)

15

Nanocuerpos de TNF- $\alpha$  monovalentes humanizados

Figura 22: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados TNF1

20 Figura 23: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados TNF2

Figura 24: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados TNF3

Figura 25: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados ALB1

25

Figura 26: Pureza de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$  humanizados (SDS-PAGE)

Figura 27: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$  humanizados

30 Figura 28: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanizados a TNF- $\alpha$  humano

Figura 29: Unión de nanocuerpos de albúmina sérica humanizados a albúmina sérica humana

Figura 30: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanizados (ELISA)

35

Nanocuerpos TNF- $\alpha$  trivalentes

Figura 31: Pureza de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  trivalentes (SDS-PAGE)

40 Figura 32: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  trivalentes

Figura 33: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  trivalentes

Nanocuerpos de TNF- $\alpha$  monovalentes humanizados (segunda tanda)

45

Figura 34: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados TNF1

Figura 35: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados TNF2

Figura 36: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados TNF3

50

Figura 37: Alineación de secuencias múltiples de nanocuerpos humanizados ALB1

Figura 38: Pureza de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanizados (SDS-PAGE)

55 Figura 39: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanizados

Figura 40: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanizados a TNF- $\alpha$  humano

Figura 41: Estabilidad: tratamiento de temperatura de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanizados (ELISA)

60

Figura 42: Análisis de TNF60 purificado en gel de SDS-PAGE teñido con plata (A) y gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie (B) y en el análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anti-NB (C) para la detección

Figura 43: Cromatograma de exclusión molecular analítico de TNF60 en Superdex HR75

- Figura 44: Unión de TNF60 a TNF-alfa humano
- 5 Figura 45: Curva de dosis-respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF-alfa humano usando Nanobody™ TNF60 en comparación con Enbrel (etanercept), Humira (adalimumab) y Remicade (infliximab)
- Figura 46: Curva de dosis-respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF- $\alpha$  de rhesus usando Nanobody™ TNF60 en comparación con Enbrel (etanercept), Humira (adalimumab) y Remicade (infliximab)
- 10 Figura 47: Perfil farmacocinético de TNF60 en ratones
- Figura 48: Perfil de inmunogenicidad de TNF60 en ratones
- 15 Figura 49: Análisis de TNF56-PEG40, TNF56-PEG60, TNF56-biotina, TNF55-PEG40, TNF55-PEG60 y TNF55-biotina purificados en gel de SDS-PAGE teñido con Coomasie
- Figura 50: Análisis de TNF56-PEG40 purificado en gel de SDS-PAGE con tinción de plata (A) tinción Coomassie (B) y en el análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anti-NB (C) para la detección
- 20 Figura 51: Cromatograma de exclusión molecular analítico de TNF56-PEG40 en Superdex HR 75
- Figura 52: Cromatograma de exclusión molecular analítico de TNF56-PEG40 en Superdex HR 200
- 25 Figura 53: Curva de dosis-respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF- $\alpha$  humano usando el Nanobody™ TNF56-PEG40 y el Nanobody™ de tipo natural monovalente TNF1 en comparación con Enbrel (etanercept), Humira (adalimumab) y Remicade (infliximab)
- Figura 54: Curva de dosis-respuesta obtenida en el ensayo de citotoxicidad con TNF- $\alpha$  de rhesus usando el Nanobody™ TNF56-PEG40 en comparación con Enbrel (etanercept), Humira (adalimumab) y Remicade (infliximab)
- 30 Figura 55: Análisis farmacocinético del Nanobody™ pegilado bivalente TNF56-PEG40 y TNF56-PEG60 después de administración intravenosa en ratones
- Figura 56: Análisis farmacocinético del Nanobody™ pegilado bivalente 3E-3E-PEG20, el Nanobody™ pegilado bivalente 3E-3E-PEG40 y el Nanobody™ biespecífico 3E-3E-AR1 después de administración intravenosa en ratones
- 35 Figura 57: Perfil de inmunogenicidad de TNF56-PEG40 y TNF56-PEG60 en ratones
- Figura 58: Eficacia de TNF60 en la prevención de poliartritis crónica en ratones
- 40 Figura 59: Eficacia de TNF60 en el tratamiento terapéutico de poliartritis crónica en ratones
- Figura 60: Efecto del formateo del Nanobody™ TNF60 sobre la eficacia en la prevención de poliartritis crónica en ratones
- 45 Figura 61: Alineación de secuencias de los Nanobodies™ PMP1C2, 3E, 1A y 3G
- Figura 62: Modelo molecular de TNF-60
- 50 Las tablas adjuntas forman una parte integrante de la presente memoria descriptiva y son las siguientes:
- Nanocuerpos TNF- $\alpha$  monovalentes
- 55 Tabla 8: Lista de secuencias de los nanocuerpos de TNF- $\alpha$
- Tabla 9: Valores de  $K_{off}$  de los nanocuerpos de TNF- $\alpha$  humanos
- Tabla 10: Homología de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$  con secuencias de línea germinal humana
- 60 Tabla 11: Niveles de expresión de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$
- Tabla 12: ELISA de unión a TNF- $\alpha$  humano y de rhesus
- 65 Tabla 13: Ensayo de inhibición del receptor de nanocuerpos de TNF- $\alpha$

	Tabla 14: Análisis mediante Biacore de nanocuerpos de TNF- $\alpha$
	Tabla 15: Unión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ a TNF- $\alpha$ (valores de $K_D$ )
5	Tabla 16: Potencia de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ para neutralizar TNF- $\alpha$ humano (a) y de rhesus (b)
	Tabla 17: DO280 nm de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$ después del tratamiento de temperatura
10	Tabla 18: Potencia de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ después del tratamiento de temperatura
	<u>Nanocuerpos de TNF-<math>\alpha</math> bivalentes</u>
	Tabla 19: Lista de secuencias de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ bivalentes y secuencias de ligador
15	Tabla 20: Constructos de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ bivalentes
	Tabla 21: Niveles de expresión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ bivalentes
20	Tabla 22: Ensayo de inhibición del receptor de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ bivalentes
	Tabla 23: Potencia de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ para neutralizar TNF- $\alpha$ humano (a) y de rhesus (b)
	Tabla 24: DO280 nm de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ bivalentes
25	<u>Nanocuerpos TNF-<math>\alpha</math> monovalentes humanizados</u>
	Tabla 25: Lista de secuencias de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$ monovalentes humanizados
30	Tabla 26: Niveles de expresión de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$ humanizados
	Tabla 27: Potencia de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ para neutralizar TNF- $\alpha$ humano
	Tabla 28: DO280 nm de nanocuerpos de albúmina sérica y TNF- $\alpha$ humanizados
35	<u>Nanocuerpos de TNF-<math>\alpha</math> trivalentes</u>
	Tabla 29: Lista de secuencias de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ trivalentes
40	Tabla 30: Constructos de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ trivalentes
	Tabla 31: Niveles de expresión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ trivalentes
	Tabla 32: Potencia de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ trivalentes para neutralizar TNF- $\alpha$ humano.
45	Tabla 33: Unión de nanocuerpos trivalentes a albúmina sérica (valores de $K_D$ )
	Tabla 34: DO280 nm de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ trivalentes
50	<u>Nanocuerpos de TNF-<math>\alpha</math> monovalentes humanizados (segunda tanda)</u>
	Tabla 35: Lista de secuencias de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ monovalentes humanizados de segunda tanda
	Tabla 36: Niveles de expresión de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ humanizados
55	Tabla 37: Potencia de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ para neutralizar TNF- $\alpha$ humano
	Tabla 38: DO280 nm de nanocuerpos de TNF- $\alpha$ humanizados
60	Tabla 39: Comparación de actividad biológica de nanocuerpos
	<u>Tablas adicionales</u>
	Tabla 40: Panorama general de oligonucleótidos usados en el formateo de Nanobodies™ trivalentes

Tabla 41: Panorama general de oligonucleótidos usados en la clonación de Nanobodies™ trivalentes

Tabla 42: Valores de EC50 obtenidos en el ensayo de citotoxicidad usando el Nanobody™ trivalente TNF60 en comparación con controles comerciales (Enbrel, Remicade, Humira)

Tabla 43: Determinación de afinidad de TNF64 y TNF24 sobre albúmina sérica humana en Biacore.

Nd, no determinado.

Tabla 44: Panorama general de oligonucleótidos usados en el formateo de Nanobodies™ bivalentes

Tabla 45: Valores de EC50 obtenidos en el ensayo de citotoxicidad usando Nanobodies™ bivalentes en comparación con los controles comerciales (Enbrel, Remicade, Humira)

Tabla 46: Resultados de los estudios de fibroblastos derivados de sinovio

Tabla 47: Resultados de los estudios de bolsa de aire murina

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Identificación de nanocuerpos específicos para TNF- $\alpha$ y albúmina sérica

Se identificaron nanocuerpos antagonistas usando dos llamas (*Llama glama*) inmunizadas con TNF- $\alpha$  humano con 6 inyecciones de 100  $\mu$ g de la citocina en intervalos semanales. La detección se realizó mediante un ensayo basado en competencia, en el que se analizaron los nanocuerpos individuales en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de TNF- $\alpha$  marcado a su receptor. Se identificaron nanocuerpos específicos de albúmina en una llama inmunizada con albúmina sérica humana. La detección de los nanocuerpos individuales se realizó mediante ELISA usando albúmina humana, de rhesus y de ratón, lo que produjo un panel de nanocuerpos que reaccionan de forma cruzada con la albúmina sérica de diversas especies.

### Ejemplo 2: Análisis de secuencia de nanocuerpos aislados

Se identificaron diferentes clases de nanocuerpos basándose en el análisis de secuencia (figura 1) usando una matriz de puntuación BLOSUM62 y punto de corte de valor de significación de similitud  $\geq$  el 60%; clase I (PMP1 C2, PMP1 G11, PMP1 H6), clase II (PMP1 G5, PMP1 H2, PMP3 G2), clase IIb (PMP1 D2), clase III (PMP3 D10, PMP5 F10). La tabla 8 enumera las secuencias de estos nanocuerpos de TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO: 52 a 60).

Basándose en el análisis de secuencia (figura 2) se identificaron diferentes clases de nanocuerpos de albúmina sérica usando una matriz de puntuación BLOSUM62 y un punto de corte de valor de significación de similitud  $\geq$  el 60%. La tabla 8 enumera las secuencias de estos nanocuerpos de albúmina sérica (SEQ ID NO: 61 a 67).

### Ejemplo 3: Análisis mediante Biacore

#### TNF- $\alpha$

Se caracterizó la unión de nanocuerpos a TNF- $\alpha$  mediante resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore 3000. El TNF de diferentes especies se unió de forma covalente a la superficie de los chips sensores CM5 por medio del acoplamiento de amina hasta que se alcanzó un aumento de 250 unidades de respuesta. Los grupos reactivos restantes se inactivaron. Se evaluó la unión del nanocuerpo a una concentración (diluido 1 en 1.000). Cada nanocuerpo se inyectó durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45  $\mu$ l/min para permitir la unión al antígeno unido al chip. Se envió el tampón de unión sin nanocuerpo sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación espontánea del nanocuerpo unido durante 4 horas. Los valores de  $K_{off}$  se calcularon a partir de los sensogramas obtenidos para los diferentes nanocuerpos.

De cada clase de nanocuerpos, se analizaron las proteínas no purificadas en Biacore. Los datos de  $K_{off}$  se enumeran en la tabla 9.

Se retuvieron nanocuerpos representativos de cada clase para el análisis posterior basándose en el valor de  $K_{off}$ . Para la clase I, se seleccionó PMP1C2 (TNF1); se seleccionó PAMPIG5 (TNF2) como representante de la clase II; se seleccionó PMP5F10 (TNF3) como representante de la clase III.

#### Albúmina sérica

Se sometió a ensayo la unión tal como se definió anteriormente excepto que se usaron diluciones de 1 en 20. Las figuras 3, 4 y 5 ilustran la detección de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  específicos de albúmina frente a albúmina sérica

humana, de rhesus y de ratón usando proteína no purificada.

Los anticuerpos se clasificaron según los valores de  $K_{off}$ , véase la siguiente tabla:

Clase	humana	Rhesus	ratón
C	PMP6A8	PMP6A8	PMP6B4
C	PMP6B4	PMP6B4	PMP6A8
B	PMP6A6	PMP6A6	PMP6A6
B	PMP6C1	PMP6C1	PMP6C1
A	PMP6G8	PMP6G8	PMP6G8
A	PMP6A5	PMP6A5	PMP6A5
D	PMP6G7	PMP6G7	PMP6G7

5

Tabla III

Las mejores  $K_{off}$  se obtuvieron para los miembros de la familia C y familia B. También se observó reactividad cruzada entre albúmina sérica humana, de rhesus y de ratón para los miembros de estas familias. Un nanocuerpo representativo de las clases B y C se definió para análisis adicional: se seleccionó PMP6A6 (ALB1) como representante de la clase B y se seleccionó PMP6AS (ALB2) como representante de la clase C.

10

#### Ejemplo 4: Clonación de nanocuerpos monovalentes en pAX051

##### Descripción del vector de expresión de *Escherichia coli*

15

*pAX051* es un derivado de pUC19. Contiene el promotor LacZ que permite una inducción controlada de la expresión usando IPTG. El vector tiene un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina. Los sitios de clonación múltiple albergan varios sitios de restricción de los cuales *Sfi*I y *Bst*TEII se usan con frecuencia para la clonación de Nanobodies™. En marco con la secuencia codificante de NB el vector codifica para una etiqueta c-myc C-terminal y una cola de (His)6. El péptido señal es la secuencia líder gen3 que transloca el Nanobody™ expresado al periplasma.

20

El ADN que codifica para los nanocuerpos seleccionados TNF1 (PMP1C2), TNF2 (PMP1G5), TNF3 (PMPF10), ALB1 (PMP6A6) y ALB2 (PMP6A8) se clonó en pAX051 y el constructo se transformó en células electrocompetentes TG1. Se analizaron los clones mediante inserto de PCR y se determinó la secuencia de nucleótidos a partir de 4 clones positivos. Se preparan disoluciones madre en glicerol a partir de los clones que contienen la secuencia correcta y se almacenaron a -80°C.

25

#### Ejemplo 5: Expresión de nanocuerpos monovalentes

30

Se inició un precultivo mediante la inoculación de una colonia individual del clon que expresa los nanocuerpos respectivos a 37°C en caldo Luria, ampicilina/carbenicilina (100 µg/ml) y glucosa al 2% durante la noche. Este precultivo se usó para inocular. El inóculo es el 1% por ciento (v/v) del cultivo de producción (medio TB + ampicilina/carbenicilina + glucosa al 1%). El cultivo de producción se hace crecer a 37°C hasta alcanzar una DO600nm de 5-10 y se induce la expresión de nanocuerpos mediante la adición de IPTG (1 mM de concentración final). La expresión de proteína se deja continuar o bien durante 4 h a 37°C o bien durante la noche a 28°C, en este momento se recogen las células mediante centrifugación y se almacenan como pasta celular húmeda a -20°C.

35

Se produjeron extractos periplásmicos preparativos de la pasta celular húmeda almacenada a -20°C mediante la resuspensión del sedimento en tampón Peri (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, pH ajustado a 8,0), haciendo rotar la mezcla durante 30 minutos a 4°C y centrifugando la mezcla usando una centrifuga preparativa (Sorvall RC-3C Plus con rotor H-6000A) para sedimentar las células. Se recoge el sobrenadante que representa un extracto en bruto del espacio periplásmico para la purificación posterior.

40

Los nanocuerpos marcados con etiqueta de His(6) se purifican mediante cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC, por sus siglas en inglés). La resina TALON (Clontech) se procesa según las instrucciones del fabricante. Los extractos se incuban con la resina durante 30 min a RT (*room temperature*, temperatura ambiente) en un rotador. La resina se lava con PBS y se transfiere a una columna. La resina empaquetada se lava con imidazol 15 mM. Los nanocuerpos se eluyen de la columna usando imidazol 150 mM. Las fracciones eluidas se analizan mediante aplicación en la membrana Hybond y visualización con Ponceau. Las fracciones que contienen proteína se reúnen y dializan frente a PBS. Las proteínas dializadas se recogen, esterilizan por filtración, se determina la concentración y se almacenan en alícuotas a -20°C.

50

Caracterización de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  monovalentesEjemplo 6: Homología con secuencias de línea germinal humana

Las secuencias de aminoácidos de nanocuerpos se compararon con las secuencias de línea germinal humana tal como se representa en la tabla 10. En el orden de homología con las secuencias humanas, los nanocuerpos se clasifican de la siguiente manera: TNF1 > TNF2 > TNF3 para los nanocuerpos de TNF- $\alpha$ ; ALB1 > ALB2 para los nanocuerpos de albúmina sérica.

Ejemplo 7: Nivel de expresión

Se calcularon los niveles de expresión y se representan en la tabla 11. En orden de rendimiento, los nanocuerpos se clasifican de la siguiente manera: TNF1 > TNF2 > TNF3 para los nanocuerpos de TNF- $\alpha$ ; ALB1 > ALB2 para los nanocuerpos de albúmina sérica.

Ejemplo 8: Análisis de SDS-PAGE

Para determinar la pureza, se analizaron muestras de proteína en un gel de SDS-PAGE al 15%. Se añadieron 10  $\mu$ l de tampón de muestra de Laemmli a 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g) de proteína purificada, la muestra se calentó durante 10 minutos a 95°C, se enfrió y cargó en un gel de SDS-PAGE al 15%. El gel se procesó según procedimientos generales y se tiñó con azul brillante de Coomassie (CBB, por sus siglas en inglés). La figura 6 representa la SDS-PAGE para los nanocuerpo específicos de TNF- $\alpha$  y específicos de albúmina sérica.

Ejemplo 9: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se cargaron 100 ng de proteína purificada en el gel. Después del SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el módulo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Biorad). La membrana se bloqueó durante la noche en PBS, caseína al 1% a 4°C.

Como todos los constructos se fusionaron a la etiqueta c-Myc, se usó el anticuerpo monoclonal anti-myc como herramienta de detección. Además, se usó anticuerpo policlonal de conejo anti-nanocuerpo (R.23) como herramienta de detección. La inmunotransferencia se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación en anticuerpo anti-myc diluido 1/2000 en PBS o anticuerpo anti-nanocuerpo 1/2000 diluido en PBS, caseína al 1%. La membrana se lavó 5 veces en PBS antes de aplicar el anticuerpo secundario (conjugado de IgG de conejo anti-ratón y fosfatasa alcalina, Sigma, A1902, diluido 1/1000 en PBS o conjugado de IgG de cabra anti-conejo y fosfatasa alcalina, Sigma, A8025, caseína al 1%). Después de la incubación con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente, la membrana se lavó 5 veces en PBS. Las inmunotransferencias se desarrollaron usando disoluciones de BCIP/NBT y la reacción se detuvo mediante el lavado de la inmunotransferencia con agua milliQ cuando fueron claramente visibles bandas. La figura 7 representa el análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 10: ELISA de unión a TNF- $\alpha$  humano y de rhesus

Se realizó un ELISA para examinar la unión a TNF- $\alpha$  humano y de rhesus. Una placa Maxisorp de 96 pocillos se recubrió con neutravidina 2  $\mu$ g/ml en PBS durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con caseína al 1% durante 2 horas a RT. Se añadió TNF- $\alpha$  biotinilado (400 ng/ml) a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a RT. Se diluyeron muestras de nanocuerpos partiendo de 2  $\mu$ g/ml y usando diluciones de 1 en 3. Los nanocuerpos se detectaron mediante anticuerpo de ratón anti-myc (diluido 1/2000) y anticuerpo de conejo anti-ratón y fosfatasa alcalina (diluido 1/200, Sigma, A1902) y pNPP (2 mg/ml) como sustrato. Las figuras 9 y 10 representan la unión en el ELISA para TNF- $\alpha$  humano y de rhesus.

Se resumen los resultados en la tabla 12. TNF1 y TNF3 muestran unión tanto a TNF- $\alpha$  humano como de rhesus. TNF2 se une a TNF- $\alpha$  humano pero solo es débilmente reactiva para TNF- $\alpha$  de rhesus.

Ejemplo 11: Ensayo de inhibición del receptor

La capacidad de inhibir la interacción receptor-ligando se analizó para TNF- $\alpha$  de rhesus y humano. Una placa Maxisorp de 96 pocillos se recubrió con Enbrel 2  $\mu$ g/ml en PBS durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con caseína al 1% durante 2 horas a RT. Se preincubaron muestras de nanocuerpos durante 30 min a RT con TNF- $\alpha$  biotinilado (10 ng/ml) partiendo de una concentración de 5  $\mu$ g/ml y usando diluciones de 1 en 2. Se añadieron muestras a las placas y se incubaron durante 1 hora a RT. Se detectó TNF- $\alpha$  biotinilado usando fosfatasa alcalina Extravidin (diluido 1/2000) y pNPP (2 mg/ml) como sustrato. Las figuras 11 y 12 representan un ELISA de inhibición para TNF- $\alpha$  humano y de rhesus. Se resumen los resultados en la tabla 13. Se observa la inhibición de la unión ligando/receptor unión para TNF1 y TNF3 tanto para TNF humano como de rhesus, mientras que TNF2 solo inhibe TNF- $\alpha$  humano.



Ejemplo 12: Análisis mediante BiacoreUnión de TNF- $\alpha$ 

El análisis se realizó tal como se describió en el ejemplo 3. Las figuras 13 y 14 ilustran la unión a TNF- $\alpha$  humano y de rhesus por medio de análisis mediante Biacore. Se resumen los resultados en la tabla 14. Los experimentos de unión en Biacore confirman los resultados de ELISA: unión con reacción cruzada para TNF1 y TNF3, mientras que TNF2 solo se une significativamente a TNF- $\alpha$  humano.

Albúmina sérica

Se sometió a ensayo la unión tal como se describió anteriormente excepto en que se usaron series de concentraciones diferentes. Cada concentración se inyectó durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45  $\mu$ l/min para permitir la unión al antígeno unido al chip. Se envió el tampón de unión sin analito sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación del nanocuerpo unido. Después de 15 minutos, se retiró el analito unido restante mediante la inyección de la disolución de regeneración (NaOH 25 mM).

A partir de los sensogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de cada analito, se calcularon los valores de  $K_D$  por medio de la afinidad en estado estacionario cuando se alcanzó el equilibrio.

Se resumen los resultados en la tabla 15. Se observa reactividad cruzada tanto para ALB1 como para ALB2. La mayor afinidad se observa para ALB2 en TNF- $\alpha$  humano y de rhesus. Sin embargo, la diferencia de afinidad para albúmina sérica humana/de rhesus frente a de ratón es más pronunciada para ALB2 (factor de 400), mientras que para ALB1 se observa una diferencia de un factor de 12.

Ejemplo 13: Bioensayo

Se usó la línea celular de fibroblastos de ratón sensibles a TNF- $\alpha$  L929 para medir la actividad anti-TNF- $\alpha$  de los nanocuerpos seleccionados. A una concentración suficientemente alta de TNF- $\alpha$  en el medio, es decir, dosis citotóxica, las células L929 experimentan necrosis. La inhibición de la interacción de TNF- $\alpha$  con su receptor se determinó mediante la preincubación una serie de diluciones de anticuerpos con una concentración citotóxica de TNF- $\alpha$  antes de añadir la mezcla a las células. La presencia de actinomicina D en el medio sensibiliza las células adicionalmente para TNF- $\alpha$ , dando como resultado un aumento de la sensibilidad del bioensayo para TNF- $\alpha$  libre.

Las células L929 se hicieron crecer hasta casi confluencia, se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a razón de 5000 células por pocillo y se incubaron durante la noche. Se añadió actinomicina D a las células a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml. Las diluciones en serie de los nanocuerpos que iban a someterse a prueba se mezclaron con una concentración citotóxica de TNF- $\alpha$  (la concentración de ensayo final es de 0,5 ng/ml o 15 UI/ml). Después de al menos 30 minutos de incubación a 37°C, esta mezcla se añadió a las células sembradas en placa. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se determinó la viabilidad celular mediante el uso de la sal de tetrazolio WST-1. Se calcularon las curvas dosis-respuesta y los valores de EC<sub>50</sub> con Graphpad Prism.

Se resumen los resultados en la tabla 16 para TNF- $\alpha$  humano y de rhesus. Basándose en su potencia para neutralizar la actividad citotóxica, las moléculas se clasifican de la siguiente manera: TNF3 > TNF1 > TNF2 para TNF- $\alpha$  humano, y TNF1 = TNF3 > TNF2 para TNF- $\alpha$  de rhesus.

Ejemplo 14: Unión a proteína A

La figura 14 representa la unión a proteína A analizada en Biacore tal como se describió en el ejemplo 12. Se obtuvo unión positiva para TNF1, TNF2, ALB1. Se observó unión débil o ninguna para TNF3 y ALB2.

Ejemplo 15: Estabilidad frente a la temperatura

Se diluyeron muestras a 200  $\mu$ g/ml y se dividieron en 8 alícuotas que contenían 500  $\mu$ l. Los diferentes viales se incubaron cada uno a una temperatura dada que osciló desde RT hasta 90°C. Después del tratamiento, las muestras se enfriaron durante 2 horas a RT, y se mantuvieron a 4°C. Los precipitados se retiraron mediante centrifugación durante 30 min a 14.000 rpm. El SN se retiró con cuidado y se analizó posteriormente.

DO280 nm

Se midió la DO a 280 nm y se calculó la concentración. Se resumen los resultados en la tabla 17. Se observó una disminución del contenido de proteína para TNF2 y TNF3 partiendo de 80°C, mientras que para ALB2 se observa partiendo de 70°C.

Inmunotransferencia de tipo Western

5 Se separaron 2 µg de proteína tratada en SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se trató tal como se describió anteriormente. Se realizó la detección usando anticuerpo policlonal anti-nanocuerpo (R23, diluido 1/2000) y anticuerpo de caballo anti-conejo-peroxidasa de rábano (DAKO, P0448, diluido 1/2000). La figura 15 representa el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se observó un claro descenso de la concentración de proteína para ALB2 tratado a 70, 80 y 90°C. Todavía se observó agregación para TNF1 tratado a 70, 80 y 90°C; para TNF3 tratado a 90°C; para ALB1 tratado a 90°C, lo que significa que el SN todavía contiene trazas de precipitados que dan como resultado una lectura de DO280nm más alta. Esto explica por qué la concentración de proteína medida a DO280nm no disminuye para TNF1, TNF3 y ALB1 tratados a estas T más altas.

ELISA

15 El ELISA para detectar la unión a TNF-α humano se realizó esencialmente tal como se describió en el ejemplo 10. Se presentan los resultados en la figura 16. La unión al TNF-α humano disminuye para TNF1, TNF2, TNF3 partiendo de 80°C.

Bioensayo

20 El bioensayo se realizó tal como se describió en el ejemplo 13. Se resumen los resultados en la tabla 18. La potencia de los nanocuerpos está disminuida para TNF1 partiendo de 70°C; para TNF2 y TNF3 partiendo de 80°C.

Biacore

25 La unión a albúmina sérica humana se determinó tal como se describió en el ejemplo 12. Se usó una concentración fija (dilución 1 en 50). Se presentan los resultados en la figura 17. El tratamiento de temperatura no influye en la unión a la albúmina sérica para ALB1. El tratamiento tiene efecto sobre la  $K_{on}$  para ALB2 partiendo de T= 70°C.

Nanocuerpos bivalentes

30 Ejemplo 16: Formateo de nanocuerpos específicos de TNF-α bivalentes

35 Se dio formato a TNF1, TNF2 y TNF3 para nanocuerpos bivalentes. Como espaciador entre los dos elementos estructurales se usó un ligador 9AA GlySer (tabla 19 SEQ ID NO: 68) o un ligador 30 AA GlySer (tabla 19 SEQ ID NO: 69). Esto generó los constructos representados por la tabla 20. La tabla 19 enumera las secuencias de estos nanocuerpos de TNF-α bivalentes (SEQ 117 NOs: 70 a 75).

Ejemplo 17: Expresión de nanocuerpos específicos de TNF-α bivalentes

40 La expresión se realizó tal como se describió en el ejemplo 5. Los nanocuerpos marcados con etiqueta de His(6) se purificaron en cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC). La resina Ni-NTA (Qiagen) se procesó según las instrucciones del fabricante. Los extractos se incubaron con la resina durante 30 min a RT en un rotador. La resina se lavó con PBS y se transfirió a una columna. La resina empaquetada se lavó con PBS (diluido 1 en 10). SE eluyó previamente la columna con imidazol 15 mM. Los nanocuerpos se eluyeron de la columna usando ácido cítrico 25 mM, pH≈4. Las fracciones eluidas se analizaron mediante aplicación en la membrana Hybond y visualización con Ponceau. Las fracciones que contenían proteína se reunieron y se purificaron adicionalmente mediante intercambio catiónico seguido por exclusión molecular. Las proteínas purificadas se recogieron, esterilizaron por filtración, se determinó la concentración y se almacenaron en alícuotas a -20°C.

50 Caracterización de nanocuerpos específicos de TNF-α bivalentes

Ejemplo 18: Nivel de expresión

55 Los niveles de expresión de los nanocuerpos de TNF-α bivalentes se calcularon y representan en la tabla 21. El ligador no tiene efecto significativo sobre el nivel de expresión de los nanocuerpos.

Ejemplo 19: SDS-PAGE

60 Se realizó SDS-PAGE tal como se describió en el ejemplo 8. La figura 18 muestra el resultado de SDS-PAGE.

Ejemplo 20: Inmunotransferencia de tipo Western

65 El análisis de inmunotransferencia de tipo Western se realizó tal como se describió en el ejemplo 9. La figura 19 representa los resultados de la inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 21: Ensayo de inhibición del receptor

5 El ensayo se realizó tal como se describió en el ejemplo 11. La figura 20 y la tabla 22 representan los resultados. La mejora de la inhibición de unión ligando/receptor se observó para todos los nanocuerpos bivalentes en comparación con el formato monovalente.

Ejemplo 22: Bioensayo

10 El ensayo se realizó tal como se describió en el ejemplo 13. Se resumen los resultados en la tabla 23. Basándose en la potencia para neutralizar la actividad citotóxica, TNF8, TNF7, TNF9 y TNF5 tienen una potencia en el intervalo de Enbrel.

Ejemplo 23: Estabilidad frente a la temperatura

15 Se analizaron muestras tal como se describió en el ejemplo 15.

DO a 280 nm

20 Se midió la DO a 280 nm y se calculó la concentración. Se resumen los resultados en la tabla 24. Se observó una disminución del contenido de proteína para TNF4 y TNF7 partiendo de 70°C, mientras que para TNF5, TNF6, TNF7, TNF8 y TNF9 se observó una disminución partiendo de 80°C.

Inmunotransferencia de tipo Western

25 Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados tal como se describió en el ejemplo 15.

ELISA

30 El ELISA para detectar la unión a TNF- $\alpha$  humano se realizó esencialmente tal como se describió anteriormente. Se presentan los resultados en la figura 21. La unión a TNF- $\alpha$  humano disminuyó para TNF5, TNF6, TNF8 y TNF9 partiendo de 80°C, para TNF4 y TNF7 partiendo de 70°C.

Nanocuerpos monovalentes humanizados

35 Ejemplo 24: Identificación de posiciones de aminoácidos no humanos en nanocuerpos específicos de TNF- $\alpha$  y albúmina sérica

40 La figura 22 (TNF1), la figura 23 (TNF2), la figura 24 (TNF3) y la figura 25 (ALB1) representan alineaciones de secuencias múltiples (Clustal W 1.7) con las secuencias de DP51, DP53, DP54 y DP29.

Además de las mutaciones de aminoácidos, se realizó la optimización de codones que produjo las secuencias de la tabla 25 SEQ ID NO: 76 a 89 (nanocuerpos de TNF-alfa y albúmina sérica humana, respectivamente).

Ejemplo 25: Generación de mutantes con codones optimizados

45 Se sintetizaron oligonucleótidos que abarcaban la secuencia completa de los nanocuerpos.

Ejemplo 26: Expresión de nanocuerpos específicos de TNF- $\alpha$  bivalentes

50 La expresión se realizó tal como se describió en el ejemplo 5.

Caracterización del nanocuerpo humanizado

Ejemplo 27: Nivel de expresión

55 La tabla 26 representa los niveles de expresión calculados. La expresión se obtuvo con rendimientos en el intervalo de 3,5-11,7 mg/ml. El tiempo de inducción no influyó en el rendimiento.

Ejemplo 28: SDS-PAGE

60 Se realizó SDS-PAGE tal como se describió en el ejemplo 8. La figura 26 representa el gel de SDS-PAGE.

Ejemplo 29: Inmunotransferencia de tipo Western

65 El análisis de inmunotransferencia de tipo Western se realizó tal como se describió en el ejemplo 9. La figura 27 representa los resultados de la inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 30: Bioensayo

5 El ensayo se realizó tal como se describió en el ejemplo 13. Los resultados de los nanocuerpos humanizados se resumen en la tabla 27. Los nanocuerpos de tipo natural se incluyen como referencia.

Ejemplo 31: Biacore

10 El análisis se realizó tal como se describió en el ejemplo 12. Las figuras 28 y 31 muestran los resultados de Biacore.

Ejemplo 32: Estabilidad frente a la temperatura

Se analizaron muestras tal como se describió en el ejemplo 15.

DO a 280 nm

Se midió la DO a 280 y se calculó la concentración. Se resumen los resultados en la tabla 28.

20 No se observa disminución significativa de la concentración de proteína para los nanocuerpos TNF1 (TNF13-14). Se observa una disminución de la concentración de proteína para los TNF2 (TNF15-19) y TNF3 (TNF20-23) humanizados partiendo de 80°C. Se observa una disminución de la concentración de proteína para ALB1 (ALB4-5) partiendo de 70°C y para ALB3 partiendo de 60°C.

Inmunotransferencia de tipo Western

25 Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados tal como se describió en el ejemplo 15.

ELISA

30 El ELISA para detectar la unión a TNF- $\alpha$  humano se realizó esencialmente tal como se describió en el ejemplo 15. Se presentan los resultados en la figura 30.

35 La unión a TNF- $\alpha$  es comparable para TNF1 WT tratado por temperatura y TNF 13 y 14 humanizados; para TNF2 WT tratado con temperatura y TNF 15-19 humanizado; la unión a TNF- $\alpha$  humano está disminuida para TNF21 y 22, y en menor medida para TNF23, mientras que no se observa efecto para TNF20 en comparación con TNF3 WT tratado con temperatura.

Nanocuerpos de TNF- $\alpha$  trivalentesEjemplo 33: Formateo de nanocuerpos específicos de TNF- $\alpha$  trivalentes

45 Se dio formato a TNF1, TNF2, TNF3 y ALB1 para nanocuerpos trivalentes. Como espaciador entre 2 elementos estructurales se usó un ligador 9AA GlySer (tabla 19, SEQ ID NO 68) o un ligador 30 AA GlySer (tabla 19 SEQ ID NO 69). Esto generó los constructos de la tabla 30. La tabla 29 enumera las secuencias de nanocuerpos de TNF- $\alpha$  trivalentes (SEQ ID NO: 91 a 94).

Ejemplo 34: Expresión de nanocuerpos específicos de TNF- $\alpha$  trivalentes

50 La expresión se realizó tal como se describió en el ejemplo 5, mediante cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC). La resina Ni-NTA (Qiagen) se procesa según las instrucciones del fabricante. Los extractos se incuban con la resina y se incuban durante 30 min a RT en un rotador. La resina se lava con PBS y se transfiere a una columna. La resina empaquetada se lava con PBS (diluido 1 en 10). Se eluye previamente con imidazol 15 mM. Los nanocuerpos se eluyen de la columna usando ácido cítrico 25 mM pH $\approx$ 4. Las fracciones eluidas se analizan mediante aplicación en la membrana Hybond y visualización con Ponceau. Las fracciones que contienen proteína se reúnen y se purifican adicionalmente con intercambio catiónico seguido por exclusión molecular. Las proteínas purificadas se recogen, esterilizan por filtración, se determina la concentración y se almacenan en alícuotas a -20°C.

Caracterización de nanocuerpos específicos de TNF- $\alpha$ /SA trivalentesEjemplo 35: Nivel de expresión

Se calcularon los niveles de expresión y se representan en la tabla 31.

Ejemplo 36: Análisis SDS-PAGE

65

Se realizó SDS-PAGE tal como se describió en el ejemplo 8. La figura 31 representa el gel de SDS-PAGE.

Ejemplo 37: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

5 El análisis de inmunotransferencia de tipo Western se realizó tal como se describió en el ejemplo 9. La figura 32 representa el análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 38: Bioensayo

10 El ensayo se realizó tal como se describió en el ejemplo 13.

Los resultados de los nanocuerpos bivalentes se resumen en la tabla 32. Basándose en su potencia para neutralizar la actividad citotóxica, las moléculas son igualmente potentes y comparables en su potencia como las moléculas bivalentes.

15 Ejemplo 39: Unión a albúmina sérica humana

Se sometió a ensayo la unión tal como se describió anteriormente excepto que se usaron series de concentraciones diferentes. Cada concentración se inyectó durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 45  $\mu$ l/min para permitir la unión al antígeno unido al chip. Después, se envió el tampón de unión sin analito sobre el chip a la misma velocidad de flujo para permitir la disociación del nanocuerpo unido. Después de 15 minutos, se retiró el analito unido restante mediante la inyección de la disolución de regeneración (NaOH 25 mM).

A partir de los sensogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de cada analito, se calcularon los valores de  $K_D$  por medio de la afinidad en estado estacionario cuando se alcanzó el equilibrio.

Se resumen los resultados en la tabla 33. Se observó una disminución de afinidad para el agente de unión ALB1 formateado en comparación con el ALB1 de tipo natural. La afinidad sin embargo está todavía en el intervalo de 7,2-1,4 nM.

30 Ejemplo 40: Estabilidad frente a la temperatura

Se analizaron muestras tal como se describió en el ejemplo 15.

35 DO a 280 nm

Se midió la DO a 280 nm y se calculó la concentración. Se resumen los resultados en la tabla 34. Se observa una disminución del contenido de proteína para TNF24, TNF27 y TNF28 partiendo de 60°C, mientras que para TNF25 y TNF26 partiendo de 70°C.

40 Inmunotransferencia de tipo Western

Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados tal como se describió en el ejemplo 15.

45 ELISA

El ELISA para detectar la unión a TNF- $\alpha$  humano se realizó esencialmente tal como se describió anteriormente. Se presentan los resultados en la figura 33. La unión a TNF- $\alpha$  humano disminuye para TNF24 y TNF27, partiendo de 60°C y para TNF25, TNF26 y TNF28 partiendo de 70°C.

50 Nanocuerpos monovalentes humanizados (segunda tanda)

Ejemplo 41: Identificación de posiciones de aminoácidos no humanos en nanocuerpos específicos de TNF- $\alpha$  y albúmina sérica

55 La figura 34 (TNF1), la figura 35 (TNF2), la figura 36 (TNF3) y la figura 37 (ALB1) representan alineaciones de secuencias múltiples (Clustal W 1.7) con las secuencias de DP51, DP53, DP54 y DP29. Las moléculas mutadas se expresaron y purificaron tal como se describió anteriormente, produciendo las secuencias de la tabla 35 SEQ ID NO: 95 a 104 (contra TNF-alfa y albúmina sérica humana, respectivamente).

60 Caracterización de nanocuerpos humanizados

Ejemplo 42: Nivel de expresión

65 La tabla 36 representa los niveles de expresión calculados. La expresión se obtuvo con rendimientos en el intervalo de 0,5-2,7 mg/ml.

Ejemplo 43: SDS-PAGE

Se realizó SDS-PAGE tal como se describió en el ejemplo 8. La figura 38 representa el gel de SDS-PAGE.

Ejemplo 44: Inmunotransferencia de tipo Western

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western se realizó tal como se describió en el ejemplo 9. La figura 39 representa los resultados de la inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 45: Bioensayo

El ensayo se realizó tal como se describió en el ejemplo 13.

Los resultados de los nanocuerpos humanizados se resumen en la tabla 37. Los nanocuerpos de tipo natural y la primera tanda de nanocuerpos humanizados se incluyen como referencia.

Ejemplo 46: Biacore

El análisis se realizó tal como se describió en el ejemplo 12. La figura 40 muestra los resultados del Biacore.

Ejemplo 47: Estabilidad frente a la temperatura

Se analizaron muestras tal como se describió en el ejemplo 15.

DO a 280 nm

Se midió la DO a 280 y se calculó la concentración. Se resumen los resultados en la tabla 38.

No se observa disminución significativa de la concentración de proteína para los nanocuerpos humanizados TNF-1 (TNF29-30). Se observa una disminución de la concentración de proteína para TNF2 (TNF31-32) y TNF3 (TNF33) humanizados partiendo de 80°C.

Inmunotransferencia de tipo Western

Se analizaron muestras para determinar la presencia de agregados tal como se describió en el ejemplo 15.

ELISA

El ELISA para detectar la unión a TNF- $\alpha$  humano se realizó esencialmente tal como se describió en el ejemplo 15. Se presentan los resultados en la figura 41.

La unión a TNF- $\alpha$  humano es comparable para TNF1 WT y los TNF29 y TNF30 humanizados; comparable para TNF2 WT y los TNF31 y TNF32 humanizados; y también para TNF3 WT y TNF33 humanizado.

Ejemplo comparativo

En este ejemplo comparativo, se compararon nueve nanocuerpos de la invención con tres nanocuerpos del documento WO 04/041862, denominados "V<sub>HH</sub>#1A" o "1A", "V<sub>HH</sub>#3E" o "3E" y "V<sub>HH</sub>#3G" o "3G" respectivamente (SEQ ID NO: 1, 4 y 5 en el documento WO 04/041862). El ensayo usado fue el ensayo basado en células usando células KYM con referencia al documento WO 04/41862 (véase por ejemplo, el ejemplo 1, en 3). Los resultados se mencionan en la siguiente tabla 34. Tal como se puede observar, los nanocuerpos de la invención tienen un valor de EC50 en este ensayo que es 18 veces mejor que el valor de EC50 de 3E, el nanocuerpo de mejor rendimiento según el documento WO 04/041862.

Ejemplo 48: Generación de Nanobodies™ humanizados biespecíficos trivalentes

Se dio formato a nanocuerpos biespecíficos trivalentes y se clonaron en el vector de expresión en *E. coli* pAX054 primero y posteriormente se rescataron a través de PCR y se clonaron en el vector de expresión pICZ $\alpha$ .

Descripción del vector de expresión de *Escherichia coli*

El pAX54 es un derivado de pUC19. Contiene el promotor LacZ que permite una inducción controlada de la expresión usando IPTG. El vector tiene un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina. Los sitios de clonación múltiple albergan varios sitios de restricción de los cuales *Sfi*I y *Bst*TEII se usan con frecuencia para la clonación de Nanobodies™. El péptido señal es la secuencia líder gen3 que transloca el Nanobody™ expresado al periplasma.

Descripción del vector de expresión de *Pichia pastoris*

El pPICZ $\alpha$ A contiene un origen de replicación derivado de pUC que permite la propagación en *E. coli*. Contiene el promotor del gen AOX1 (alcohol oxidasa 1) de *Pichia pastoris*. Esta región promotora de 942 pb (i) permite la expresión de alto nivel inducible con metanol del gen de interés, y (ii) selecciona como diana la integración del plásmido al locus AOX1 después de la transformación de *Pichia* con el ADN vector que se linealiza dentro de la región promotora en 5' AOX1. Debe observarse que los vectores pPICZ $\alpha$  no contienen un origen de replicación de levaduras y que, en consecuencia los transformantes solo se pueden aislar si se produce recombinación entre el plásmido y el genoma de *Pichia*. El vector especifica la resistencia al antibiótico zeocina en células huésped tanto de *E. coli* como de *Pichia pastoris*. El vector incorpora la señal de secreción del factor de apareamiento  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción eficiente de la mayor parte de las proteínas al medio de cultivo. El ATG de iniciación en la secuencia señal del factor  $\alpha$  corresponde al ATG de iniciación nativo del gen AOX1. El sitio de clonación múltiple alberga varios sitios de restricción de los cuales se usan normalmente *Xho1/EcoR1* o *Xho1/Not1* para la fusión de las secuencias codificantes de Nanobody™ a la señal de secreción. El sitio de clonación múltiple es seguido por la región de terminación de la transcripción de AOX1. Más detalles sobre este vector de expresión pueden hallarse en el sitio web de Invitrogen ([http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha\\_man.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)).

Formateo de nanocuerpos trivalentes

Se configuraron tres reacciones de PCR independientes para amplificar la subunidad N-terminal, la central y la C-terminal del Nanobody™ usando las combinaciones de oligos indicadas en WPA-0012. El Nanobody™ N-terminal se amplificó usando M13\_rev/Rev\_9GlySer\_L108; el Nanobody™ central se amplificó usando For\_GlySer/Short y Rev\_15BspEI\_L108; el Nanobody™ C-terminal se amplificó usando For\_BspEI/M13\_for. Se preparó una reacción de PCR de 1  $\mu$ l de ADN de plásmido (50-100  $\mu$ g), 1,5  $\mu$ l de cebador directo (10  $\mu$ M  $\rightarrow$  300 nM), 1,5  $\mu$ l de cebador inverso (10  $\mu$ M  $\rightarrow$  300 nM), 1  $\mu$ l de dNTP (10 mM  $\rightarrow$  0,2 mM), 5  $\mu$ l de tampón (10x  $\rightarrow$  1x), 0,75  $\mu$ l de enzima (3,5 U/ $\mu$ l  $\rightarrow$  2,6 U/ $\mu$ l) y 39,25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O con un volumen total de 50  $\mu$ l. Las secuencias del cebador se facilitan en la tabla 40. Se inició un programa de PCR con 2 minutos a 94°C. Un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C se repitió 30 veces y estuvo seguido por 10 minutos a 72°C. La amplificación se verificó mediante la separación de 5  $\mu$ l de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 2%. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick según las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y se eluyó con 50  $\mu$ l de tampón EB. El fragmento de VHH N-terminal se preparó mediante la incubación de 50  $\mu$ l de ADN y 2  $\mu$ l de *BamHI* (10 U/ $\mu$ l) en el tampón apropiado recomendado por el fabricante a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 2  $\mu$ l de *SfiI* (10 U/ $\mu$ l) y se incubó la mezcla a 55°C durante 2 horas. El fragmento de V<sub>HH</sub> medio se preparó mediante la incubación de 50  $\mu$ l de ADN y 2  $\mu$ l de *BamHI* (10 U/ $\mu$ l) en el tampón apropiado recomendado por el fabricante a 37°C durante 2 horas. El fragmento de V<sub>HH</sub> C-terminal se preparó mediante la incubación de 50  $\mu$ l de ADN y 2  $\mu$ l de *BspEI* (10 U/ $\mu$ l) en el tampón apropiado recomendado por el fabricante a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 2  $\mu$ l de *BstEII* (10 U/ $\mu$ l) y se incubó la mezcla a 60°C durante 1 hora. Las reacciones de digestión previas se separaron en un gel de agarosa al 2%. Las bandas de VHH (350-450 pb) se cortaron del gel y se purificó el ADN usando el kit de extracción en gel QIAquick según las instrucciones del fabricante. Se usó una columna (con un máximo de 400 mg de gel de agarosa por columna) y el ADN unido se eluyó con 50  $\mu$ l de tampón EB. Se determinó la concentración de ADN mediante la medición de la DO<sub>260</sub> (1 unidad de DO = 50  $\mu$ g/ml). Se preparó una mezcla de ligamiento con un volumen final de 10  $\mu$ l que contenía 100 ng de vector pAX54, 12 ng de VHH N-terminal, 12 ng de fragmento central de VHH, 12 ng de fragmento C-terminal de VHH, 1  $\mu$ l de tampón de ligamiento y 1  $\mu$ l de ligasa (3 U) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La transformación de *E. coli*, TG1 se realizó usando 2  $\mu$ l de mezcla de ligamiento. Las colonias se analizaron mediante PCR tal como se describió en WPA-0010. El análisis de secuencia se realiza en los clones positivos. La preparación del plásmido se realizó mediante el kit Qiaprep spin Miniprep (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y se describió anteriormente. La secuenciación se realizó en la instalación de secuencias de VIB, Amberes, Bélgica.

Amplificación del ADN codificante

La región codificante del Nanobody™ en el vector de expresión de *E. coli* AX054 se rescata a través de PCR mediante un par de cebadores apropiado. Para asegurarse de que el Nanobody™ se expresa con un extremo N-terminal nativo, la región codificante se clona en marco con el sitio de escisión Kex2 de la señal de secreción. El cebador directo se fusiona a la parte C-terminal de la señal de secreción, hasta el sitio de reconocimiento *XhoI* hasta la región codificante del Nanobody™. Se preparó una reacción de PCR de 1  $\mu$ l de ADN de plásmido (50-100 ng), 1,5  $\mu$ l de cebador directo (10  $\mu$ M  $\rightarrow$  300 nM), 1,5  $\mu$ l de cebador inverso (10  $\mu$ M  $\rightarrow$  300 nM), 1  $\mu$ l de dNTP (10 mM  $\rightarrow$  0,2 mM), 5  $\mu$ l de tampón (10x  $\rightarrow$  1x), 0,75  $\mu$ l de enzima (3,5 U/ $\mu$ l  $\rightarrow$  2,6 U/ $\mu$ l) y 39,25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O con un volumen total de 50  $\mu$ l. Las secuencias de cebador se facilitan en la tabla 41. Se inició un programa de PCR con 2 minutos a 94°C. Un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C se repitió 20 veces y estuvo seguido por 10 minutos a 72°C. La amplificación se verificó mediante la separación de 5  $\mu$ l de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 2%. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick según las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y se eluyó el ADN unido con 50  $\mu$ l de tampón EB.

Estrategia de clonación

El fragmento de ADN que codifica para el vector de expresión de NB así como pPICZ $\alpha$ A se digiere con las enzimas de restricción apropiadas (*XhoI* + *NotI*). El inserto se obtiene mediante la incubación de 50  $\mu$ l de producto de PCR con 2  $\mu$ l de *XhoI* (10 U/ $\mu$ l) y 2  $\mu$ l de *NotI* (10 U/ $\mu$ l) en el tampón apropiado recomendado por el fabricante durante 3 horas a 37°C. El vector se obtiene de modo similar, adaptando la cantidad de enzimas de restricción a la cantidad de plásmido. Tanto el vector como el fragmento que codifica para NB se purifican y se cuantifica la concentración de ADN usando el equipo BioPhotometer (Eppendorf). El fragmento y el vector aceptor se ligan en una razón equimolar mediante el uso de 1 unidad de ligasa de T4 (Promega) durante 30 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 16°C. El ADN (20-30 ng) se transforma en células TG1. Las colonias se analizan a través de PCR usando los cebadores 3'AOXI R y 5'AOXI F. El análisis de secuencia se realiza en los clones positivos. Se da formato a TNF30, TNF33 y ALB8 para Nanobodies™ biespecíficos trivalentes. Como espaciador entre los elementos estructurales se usó un ligador 9AA GlySer.

Transformación en *P. pastoris*

Para aislar el ADN de plásmido, se inicia un precultivo mediante la inoculación de una colonia individual del clon en 50 ml de caldo Luria + ampicilina o carbenicilina (100  $\mu$ g/ml) + glucosa al 2% e incubación a 37°C durante la noche. Se prepara ADN de plásmido mediante el kit Plasmid Midi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ADN se linealiza mediante la incubación de 30  $\mu$ g de ADN de plásmido con 6  $\mu$ l de *BstXI* (10 U/ $\mu$ l) en el tampón apropiado según las instrucciones del fabricante durante 3 horas a 45°C. El ADN digerido se purifica usando el kit de purificación de PCR (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ADN se concentra mediante precipitación con EtOH según procedimientos convencionales. Se transforman células electrocompetentes X-33 con 10  $\mu$ g de ADN linealizado y las células se dejan crecer durante 48 h sobre una placa de agar YPD selectivo que contiene zeocina (100/250/500  $\mu$ g/ml). La X-33 es una cepa de *Pichia pastoris* de tipo natural; la propia cepa así como las cepas recombinantes derivadas contienen el gen *AOX1* nativo y son capaces de metabolizar metanol (*Mut*<sup>+</sup>).

Se examinan los clones para determinar el nivel de expresión mediante la inoculación de colonias individuales en 1 ml de BGCM en una placa de 24 pocillos y se hacen crecer durante 48 h a 30°C a 120 rpm. Las células se centrifugan y se añade BGCM nuevo a las células para el crecimiento a 30°C a 120 rpm durante 48 h. Después, se añade MeOH a una concentración final del 0,5% y las células se hacen crecer a 30°C a 120 rpm durante 8 h, después de lo cual se añade MeOH a una concentración final del 0,5%. Las células se hacen crecer durante la noche a 30°C a 120 rpm. Las células se centrifugan y se recoge el sobrenadante y se analiza en ELISA tal como se describió en el ejemplo 10.

Ejemplo 49: Expresión y purificación de Nanobodies™ humanizados biespecíficos trivalentesProducción en *Pichia pastoris*

La composición de tampones, disoluciones y otros se pueden hallar en el sitio web de Invitrogen ([http://www.invitrogen.com/content/sffs/manuals/ppiczalpha\\_man.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sffs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)). Se inició un precultivo mediante la inoculación de una colonia individual de una placa en 5 ml de YPD. El cultivo se hizo crecer durante la noche a 180 rpm y 30°C. Al día siguiente, se diluyó el precultivo hasta 50 ml de YPD y se hizo crecer durante la noche a 180 rpm y 30°C. Los cultivos de producción se iniciaron mediante la inoculación del precultivo a una DO600nm final = 0,04-0,08. Los cultivos se hicieron crecer en BGCM durante 24 h a 30°C a 180 rpm y se centrifugaron a 4.500 rpm durante 30 minutos. Las células se resuspendieron en 1/3 del volumen original en medio BGCM con una DO600nm final = 15-20 final. Las células se indujeron con MeOH en puntos de tiempo regulares, normalmente 3 veces/día, nunca superando el 1% del contenido de MeOH. Después de 50 horas de inducción se recoge el sobrenadante.

Purificación de nanocuerpos expresados en *Pichia pastoris*

El sobrenadante del cultivo se filtra sobre una membrana de filtración de 0,22  $\mu$ m Micro filtration (Hydrosart, Sartorius). La muestra se concentra usando diafiltración en una membrana de ultrafiltración de 10 kDa (HydroSart, Sartorius) y se concentró hasta 0,5-1 l.

Los Nanobodies™ se purifican usando cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect Xtra, GE Healthcare) usando PBS como tampón de ejecución y glicina (100 mM pH=2,5) para la elución. Las muestras se neutralizan usando Tris 1,5 M pH=8,8. Los Nanobodies™ se procesan adicionalmente en cromatografía de intercambio aniónico (Source 30Q, GE Healthcare). Las muestras se diluyen 10 veces con piperazina 10 mM pH=10,2 y se ajusta a pH=10,2 con NaOH 1 M y una conductividad < 2mS/cm con agua MilliQ.

Los nanocuerpos se procesan en cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75pg, Hiload XK26/60, GE Healthcare) y el LPS se retira mediante cromatografía de intercambio aniónico (Source 30Q, GE Healthcare) mediante el paso a través de una columna de 5 ml, que se desinfecta con NaOH 1 M y se equilibra en PBS de Dulbecco.



Para determinar la pureza, se analizaron muestras de proteína en un gel de SDS-PAGE al 15% tal como se describió en el ejemplo 8. El gel se procesa usando el kit SilverQuest™ según los procedimientos generales descritos por el fabricante (Invitrogen). Alternativamente, el gel se procesa mediante azul brillante de Coomassie o en inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió en los ejemplos 8 y 9. Los resultados se facilitan en la figura 42.

#### Ejemplo 50: Caracterización de Nanobodies™ humanizados biespecíficos trivalentes

TNF60 consiste en 363 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 38.441 Da. El pI es de 8,71. El coeficiente de extinción a 280 nm es de 1,736.

#### Espectrometría de masas

La masa de la proteína se determinó en ESI-EM según procedimientos convencionales.

La masa teórica de TNF60 es de 38.441 Da. La proteína tiene 2 puentes S-S que deben da como resultado una masa de 38.435 Da en ESI-EM. La masa que se determinó experimentalmente para TNF60 derivado de 3 lotes diferentes oscila desde 38.433 Da hasta 38.435 Da, que difiere como máximo el 0,005% con la masa teórica.

#### Secuenciación N-terminal

La secuenciación N-terminal se realizó mediante la degradación de Edman según procedimientos convencionales. La secuenciación N-terminal mostró que la secuencia de la proteína para los primeros 7 aminoácidos es la siguiente: EVQLVES. Esto concuerda con la secuencia de la proteína teórica, lo que indica el procesamiento N-terminal apropiado.

#### Dimensionamiento analítico

Se analizaron muestras (100 ug) en la columna de alta resolución Superdex75, para caracterizar los diferentes lotes de Nanobody™. La cromatografía de exclusión molecular del Nanobody™ produce normalmente un pico simétrico, con un tiempo de retención de 11,5 ml en Superdex75. La absorbancia se registra normalmente a 280, 254 y 214 nm. La medición a 214 nm permite una mayor sensibilidad de detección. El dimensionamiento analítico en PBS proporciona un pico simétrico. No se observaron contaminantes. El tiempo de retención observado para 3 lotes diferentes es de 11,5-11,55 ml. Se muestra un perfil representativo en la figura 43.

#### Ejemplo 51: Unión de TNF60 a TNF $\alpha$ humano en ELISA

La funcionalidad de TNF60, es decir la unión a TNF- $\alpha$  humano se analizó mediante ELISA tal como se describió en el ejemplo 10. Se resumen los resultados en la figura 44 y demuestran claramente una unión dependiente de la dosis y saturable de 2 lotes de TNF60 a TNF- $\alpha$  humano.

#### Ejemplo 52: Funcionalidad del ensayo basado en células

La potencia para neutralizar la actividad citotóxica de TNF $\alpha$  se analizó en un ensayo basado en células tal como se describió en el ejemplo 13. Se resumen los resultados en la tabla 42 y en las figuras 45 y 46.

Los datos muestran que TNF60 tiene una potencia en el intervalo de Enbrel/etanercept y una potencia 10 veces mejor que Humira/adalimumab y Remicade/infliximab.

#### Ejemplo 53: Unión de TNF60 a albúmina sérica

La unión a albúmina sérica humana y de rhesus se analizó en Biacore tal como se describió en el ejemplo 12. Los valores de  $K_D$ ,  $K_{on}$  y  $K_{off}$  se representan en la tabla 43. TNF60 se compara con TNF24, que es el Nanobody™ biespecífico trivalente original con elementos estructurales de tipo natural.

La afinidad de TNF60 por albúmina sérica humana y de rhesus es similar. La afinidad es 2 veces menor en comparación con la afinidad observada para TNF24 que es el análogo de tipo natural de TNF60.  $K_{on}$  es idéntica para ambas moléculas, pero la  $k_{off}$  es 2 veces mayor para TNF60.

#### Ejemplo 54: Análisis farmacocinético y de inmunogenicidad de los nanocuerpos humanizados biespecíficos trivalentes en ratones

#### Animales

Se calentaron ratones DBA1 o BALBc bajo una lámpara infrarroja y se les inyectaron 200  $\mu$ l de Nanobody™ (100  $\mu$ g

por ratón) por vía intravenosa en la cola. Se obtuvieron muestras de sangre en diferentes puntos de tiempo haciendo una pequeña incisión en la cola y recogiendo la sangre en un microtubo. Normalmente, se tomaron muestras de sangre a t=15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 14 días. Se preparó suero según procedimientos convencionales.

5 Determinación de la concentración de Nanobody™ en suero de ratón

Una placa de microtitulación (NUNC, Maxisorb) se recubrió con neutravidina 2 µg/ml durante la noche a 4°C. La placa se lavó 5 veces con PBS/Tween-20 al 0,05% y se bloqueó durante 2 horas a RT con PBS/caseína al 1%. Se aplicó 10 TNF-α humano biotinilado (1/2000 en PBS/caseína al 0,2%; 400 ng/ml) a los pocillos y se incubó durante 1 h a RT. El Nanobody™ de referencia patrón se aplicó partiendo de una concentración de 5 µg/ml y usando diluciones de 5 veces en PBS que contenía plasma de ratón al 1%. Los Nanobodies™ se dejaron unir durante 2 horas a RT. La placa se lavó 5 veces y se aplicó anticuerpo policlonal de conejo anti-nanocuerpo (R23) a una dilución de 2000 veces durante una 15 hora a RT. Después del lavado de la placa, se detectó la unión con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo-HRP (DAKD) a una dilución de 3000 durante una hora a RT, y se tiñó con ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se midió la DO405nm.

Este primer ELISA se usó para determinar el intervalo lineal de la referencia patrón. En un segundo ELISA, la referencia patrón se usó en concentraciones en este intervalo lineal y normalmente usando diluciones de 2 veces. En este 20 segundo ELISA, se diluyeron muestras de ensayo de suero 100 veces y se prepararon diluciones de 5 veces adicionales en plasma de ratón al 1%, para determinar la dilución a la que las muestras de suero proporcionan una lectura en el intervalo lineal de la curva patrón. En un tercer ELISA, se diluyen muestras de suero a una concentración apropiada determinada en el segundo ELISA y usando diluciones de 2 veces para la determinación exacta de la concentración de Nanobody™ en las muestras de suero.

25 Se realizaron experimentos para determinar el perfil farmacocinética de TNF60 en ratones (n = 3). Un valor de C<sub>max</sub> de 103,84 ± 31 µg/ml se alcanzó 15 minutos después de la administración. Se determinó que la semivida (t<sub>1/2β</sub>) es de 1,9 días, similar a la semivida de la albúmina sérica de ratón, lo que indica que TNF60 adopta la semivida de la albúmina sérica. Se presentan los datos en la figura 47.

30 Determinación de anticuerpos anti-nanocuerpos en ratones

El Nanobody™ se recubrió a 5 µg/ml en PBS a 4°C durante la noche. La placa se lavó 5 veces con PBS/Tween-20 al 0,05% y se bloqueó durante 2 horas a RT con PBS/caseína al 1%. Se diluyeron muestras de suero 100 veces y se 35 aplicaron a los pocillos para incubación durante 1 h a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón-HRP diluido 1000 veces (DAKO, P0260) y usando ABTS como sustrato.

Se diluyeron muestras de suero 50 veces y analizaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-TNF60 de ratón. La falta de inmunogenicidad se demostró para TNF60. Se presentan los datos en la figura 48.

40 Ejemplo 55: Generación de Nanobodies™ humanizados de larga vida bivalentes

Descripción del vector de expresión de Pichia pastoris:

Véase el ejemplo 48

45 Formateo de Nanobodies™ bivalentes

Se configuraron dos reacciones de PCR independientes para amplificar la subunidad N-terminal y C-terminal del Nanobody™ mediante los procedimientos indicados en WPA-0011. Para la amplificación del Nanobody™ N-terminal se usaron PiForLong y Rev\_30GlySer\_L108 como combinación de cebadores; para la amplificación del Nanobody™ 50 C-terminal se usaron For\_GlySer y PiRevCys1hum o alternativamente For\_GlySer y PiRevCys2hum, introduciéndose los sitios de restricción requeridos para el formateo y los residuos de cisteína libres requeridos para las modificaciones C-terminales.

55 Se preparó una reacción de PCR de 1 µl de ADN de plásmido (50-100 µg), 1,5 µl de cebador directo (10 µM → 300 nM), 1,5 µl de cebador inverso (10 µM → 300 nM), 1 µl de dNTP (10 mM → 0,2 mM), 5 µl de tampón (10x → 1x), 0,75 µl de enzima (3,5 U/µl → 2,6 U/µl) y 39,25 µl de H<sub>2</sub>O con un volumen total de 50 µl. Las secuencias de cebador se facilitan en la tabla 44. Se inició un programa de PCR con 2 minutos a 94°C. Un ciclo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C se repitió 30 veces y estuvo seguido por 10 minutos a 72°C. La amplificación se 60 verificó mediante la separación de 5 µl de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 2%. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación PCR QIAquick según las instrucciones del fabricante. Se usó una columna y se eluyó con 50 µl de tampón EB. El fragmento de VHH N-terminal se preparó mediante la incubación de 50 µl de ADN y 2 µl de BamHI (10 U/µl) y 2 µl de XhoI (10 U/µl) en el tampón apropiado recomendado por el fabricante a 37°C durante 1,5 horas. El fragmento de VHH C-terminal se preparó mediante la incubación de 50 µl de ADN y 2 µl de 65 BamHI (10 U/µl) y 2 µl de EcoRI (10 U/µl) en el tampón apropiado recomendado por el fabricante a 37°C durante 1

hora. Las reacciones de digestión previas se separaron en un gel de agarosa al 2%. Las bandas de VHH (350-450 pb) se cortaron del gel y se purificó el ADN usando el kit de extracción en gel QIAquick según las instrucciones del fabricante. Se usó una columna (con un máximo de 400 mg de gel de agarosa por columna) y se eluyó el ADN unido con 50 µl de tampón EB. Se determinó la concentración de ADN mediante la medición de la DO<sub>260</sub> (1 unidad de DO = 50 µg/ml). Se preparó una mezcla de ligamiento con un volumen final de 10 µl que contenía 100 ng de vector pPICZαA, linealizado con *XhoI/EcoRI*, 30 ng de VHH N-terminal, 30 ng de fragmento VHH C-terminal, 1 µl de tampón de ligamiento y 1 µl de ligasa (3 U) y se incubó durante 1 hora a RT. La transformación de *E. coli*, TG1 se realizó usando 2 µl de mezcla de ligamiento. Las colonias se analizan mediante PCR tal como se describió en WPA-0010, pero usando la combinación de cebadores AOXIFor/AOXIRev. El análisis de secuencia se realiza en los clones positivos. La preparación del plásmido se realizó mediante el kit Qiaprep spin Miniprep (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y se describió anteriormente. La secuenciación se realizó en la instalación de secuencias, Amberes, Bélgica.

#### Transformación en *P. pastoris*

Véase el ejemplo 48.

Se dio formato a TNF30 para Nanobodies™ bivalentes. Como espaciador entre los 2 elementos estructurales se usó un ligador 30 AA GlySer. Para permitir las modificaciones específicas de sitio C-terminales, se introdujo una cisteína libre, o bien como el último AA del Nanobody™ o bien con un espaciador extra que consiste en GlyGlyGlyCys.

#### Ejemplo 56: Expresión y purificación de Nanobodies™ humanizados de larga semivida bivalentes

##### Producción en *Pichia pastoris*

Véase el ejemplo 49

##### Purificación de nanocuerpos bivalentes

El medio de cultivo se preparó libre de células por medio de centrifugación y filtración en filtro de 0,22 µm. El medio estéril se almacenó a 4°C hasta el procesamiento posterior. Los contaminantes de bajo peso molecular se redujeron mediante ultrafiltración en una membrana de ultrafiltración (UF) de 10 kDa (HydroSart Sartocoon Slice Cassette, Sartorius) de la siguiente manera: se concentraron cuatro litros de medio hasta 0,5-1 litro, posteriormente se diluyeron con 5 litros de PBS y se concentraron de nuevo hasta 0,5 litros. Esta acción se llevó a cabo dos veces.

El material retenido de la UF se filtró a través de membranas de nailon de 47 mm, 0,45 µm (Alltech #2024).

En una siguiente etapa, se capturó el Nanobody™ bivalente a partir del medio concentrado por medio de purificación de afinidad de proteína A (usando resina MabSelectXtra™, GE Healthcare). La columna [35X100mm] se equilibró en PBS y después de la aplicación de la muestra se lavó exhaustivamente con PBS. El TNF56 se eluyó con glicina [100 mM, pH=2,5].

Las fracciones eluidas de MabSelectXtra™ se neutralizaron con Tris [1,5 M, pH 8,8] y se almacenaron a 4°C. El TNF56 se concentró y purificó por medio de AEX (A = piperazina 10 mM, pH 10,8 y B = NaCl 1 M en Tris 50 mM, pH 7,5) usando Source 30Q (GE Healthcare). Para ello, las fracciones de Nanobody™ se diluyeron con tampón A (piperazina 10 mM, pH 10,8) a una conductividad de 5 mS/cm y se ajustó el pH a 10,8. La columna [25X100mm] se equilibró en tampón A antes de cargar la muestra sobre la columna. El TNF56 se eluyó con un gradiente de 5 volúmenes de columna (VC). El pH de las fracciones recogidas se ajustó a 7,8 mediante Tris 1 M pH=7,8.

##### Pegilación de Nanobodies™ bivalentes expresados en *Pichia pastoris*

##### Reducción de cisteínas C-terminales

Se añadió ditioneitol (DTT, Aldrich cat. 15,046-0) a las fracciones neutralizadas para reducir los potenciales puentes disulfuro que se formaron entre las cisteínas carboxilo-terminales de los Nanobodies™ (habitualmente alrededor del 20%). Se halló que una concentración final de 10 mM de DTT e incubación durante la noche a 4°C es óptimo. La reducción se evaluó mediante cromatografía analítica de exclusión molecular (SEC). En consecuencia, se añadieron 25 µl de Nanobody™ reducido a 75 µl de D-PBS y se inyectaron en una columna Sup75 101300 GL equilibrada con PBS de Dulbecco (D-PBS, Gibco™ REF. 14190-094).

El Nanobody™ no reducido y DTT se retiraron mediante SEC preparativa en una columna Hiload 26160 Superdex75 de grado preparativo equilibrada con D-PBS.

Se midió la concentración del Nanobody™ reducido mediante la medición de la absorbancia a 280 nm. Se usó un espectrofotómetro UV/VIS de doble haz Uvikon 943 (método: véase el SOP ABL-0038). Se midió la absorción en un barrido de longitud de onda de 245-330 nm. Se usaron dos celdas Precision compuestas por cuarzo Suprasil® (tipo

Hellma n.º: 104-QS; camino óptico: 10 mm), Primero se midió la absorción del blanco a 280 nm mediante la colocación de las dos celdas llenas con 900 µl de D-PBS. La muestra se diluyó (1/10) mediante la adición de 100 µl de la muestra a la primera celda. La absorción de la muestra se midió a 280 nm.

$$\frac{DO_{280} \text{ Muestra} - DO_{280} \text{ Blanco}}{\epsilon \times l} \times 10$$

5 Se calculó la concentración con la siguiente fórmula:

Para TNF55:  $\epsilon = 1,85$

Para TNF56:  $\epsilon = 1,83$ .

10

### Pegilación

Para pegilar el Nanobody™ se añadió un exceso molar 5X de una disolución de PEG40 1 M recién preparada a la disolución de Nanobody™ reducido. (MPEG2-MAL-40K de NEKTAR™)

15

Transforming Therapeutics (2D3YOTO1) PM = 40.000 g/mol; MPEG2-MAL-60K de NEKTAR™ Transforming Therapeutics (2D3YOVO1) PM = 60.000 g/mol).

20

La mezcla de Nanobody™-PEG se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT, *room temperature*) con agitación suave y posteriormente se transfirió a 4°C. La pegilación se evaluó por medio de SEC analítica. En consecuencia, se añadieron 25 µl de Nanobody™ reducido a 75 µl de D-PBS y se inyectaron en una columna Sup75 101300 GL equilibrada con PBS de Dulbecco. El Nanobody™ pegilado eluyó en el intervalo del volumen de exclusión de la columna (> 75 kDa).

25

El Nanobody™ pegilado y no pegilado se separaron por medio de cromatografía de intercambio catiónico (CEX, usando Source30S, GE Healthcare; tampón A = ácido cítrico 25 mM pH=4 y B = NaCl 1 M en PBS). La muestra se diluyó hasta una conductividad < 5 mS/cm y se ajustó el pH a 4,0. La columna [25X100mm) se equilibró y después de la aplicación de muestra se lavó exhaustivamente con tampón A. El Nanobody™ PEGilado se eluyó con un gradiente de 3 VC.

30

Se intercambió el tampón del Nanobody™ recogido a D-PBS mediante SEC en una columna Hiload 26/60 Superdex 75 de grado preparativo equilibrada en D-PBS.

35

Finalmente el Nanobody™ se preparó libre de LPS por medio del paso por una columna de intercambio aniónico (Source30Q). La columna (10x100mm) se desinfectó durante la noche en NaOH [1 M] y después se equilibró en D-PBS libre de endotoxinas.

### Biotinilación

40

Para biotinilar el Nanobody™ se añadió un exceso molar 5X de biotina (EZ-Link®-maleimida-PO2-biotina, Pierce #21901) a partir de una disolución madre 10 mM al Nanobody™ reducido (véase 5.5.1). La mezcla de biotina-Nanobody™ se incubó durante 1 h a RT con agitación suave y posteriormente se almacenó a 4°C.

45

La pureza de Nanobody™ biotinilado se controló por medio de SEC analítica. En consecuencia, se añadieron 25 µl de Nanobody™ biotinilado a 75 µl de D-PBS y se inyectaron en una columna Sup75 10/300 GL equilibrada en D-PBS. A partir del cromatograma obtenido se pudo concluir que el Nanobody™-biotina no necesita purificación adicional: no se pudo detectar dimerización del Nanobody™ por medio de una oxidación de sulfhidrilos libres. Se realizó un cambio de tampón a D-PBS mediante un paso por una columna de desalación Sephadex G25 fine (90 ml).

50

Finalmente se preparó un Nanobody™-biotina libre de LPS mediante el paso por una columna de intercambio catiónico (Source30Q, GE Healthcare). La columna (1x10 cm) se desinfectó durante la noche en NaOH [1 M] y después se equilibró en D-PBS.

55

Para determinar la pureza, se analizaron muestras de proteína en un gel de SDS-PAGE al 15% tal como se describió en los ejemplos 8 y 49. Se presentan los resultados en las figuras 49 y 50.

### Ejemplo 57: Caracterización de Nanobodies™ humanizados de larga semivida bivalentes

60

#### Caracterización bioquímica

El TNF55 consiste en 260 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 27.106 Da. El pI es de 8,67. El

coeficiente de extinción a 280 nm es de 1,850.

El TNF56 consiste en 264 aminoácidos. La proteína tiene un peso molecular de 27.365 Da. El pI es de 8,67. El coeficiente de extinción a 280 nm es de 1,830.

#### Espectrometría de masas

La masa teórica de TNF55 es de 27.106 Da. La proteína TNF55-biotina tiene 2 puentes S-S y una modificación de biotina que debe dar como resultado una masa de 27.627 Da en ESI-EM. La masa que se determinó experimentalmente para TNF55-biotina es de 27.627 Da.

La masa teórica de TNF56 es de 27.365 Da. La proteína TNF56-biotina tiene 2 puentes S-S y una modificación de biotina que debe dar como resultado una masa de 27.886 Da en ESI-EM. La masa que se determinó experimentalmente para TNF56-biotina es de 27.886 Da.

#### Secuenciación N-terminal

La secuenciación N-terminal de TNF56-PEG40 mostró que la secuencia de la proteína para los primeros 7 aminoácidos es la siguiente: EVQLVES. Esto concuerda con la secuencia de la proteína teórica, lo que indica un procesamiento N-terminal apropiado.

#### Dimensionamiento analítico

El dimensionamiento analítico de TNF56-PEG40 en PBS proporciona un pico simétrico. No se observaron contaminantes. El tiempo de retención observado es de 8,5 ml en Superdex HR 75 y 10,32 ml en Superdex HR 200. Se muestra un perfil representativo en las figuras 51 y 52.

#### Ejemplo 58: Funcionalidad del ensayo basado en células

Se analizó la potencia para neutralizar la actividad citotóxica de TNF $\alpha$  en un ensayo basado en células. Se examinó la potencia a diferentes concentraciones de Nanobody™ así como de Enbrel, Humira y Remicade disponibles comercialmente con una base molar. Cuanto mayor es la EC50 observada, menor es la actividad del compuesto para neutralizar TNF- $\alpha$ .

Se resumen los resultados en la tabla 45 y las figuras 53 y 54.

Los datos muestran un aumento de la potencia para los Nanobodies™ bivalentes cuando se compararon con el Nanobody™ monovalente TNF1. La potencia de los derivados de TNF5S es similar a la de los derivados de TNF56, que está en el intervalo de Enbrel y es 10 veces mejor que para Humira y Remicade.

#### Ejemplo 59: Análisis farmacocinético y de inmunogenicidad de nanocuerpos humanizados de larga semivida bivalentes en ratones

Véase el ejemplo 54

Se realizaron experimentos con el fin de examinar la semivida de Nanobodies™ pegilados en ratones. La semivida de TNF56-PEG40 bivalente se comparó con la semivida de TNF56-PEG60. Ambos Nanobodies™ tienen una semivida comparable de ~ 2 días. Se presentan los resultados en la figura 55.

Además, se exploró la semivida de 3E-3E bivalente pegilado. La semivida de 3E-3E-PEG20 se comparó con la semivida de 3E-3E-PEG40 después de la administración intravenosa de 100  $\mu$ g de los Nanobodies™. 3E-3E-PEG20 tiene una semivida de 17 h, mientras que 3E-3E-PEG40 tiene una semivida de 2,1 días, comparable a la semivida de 3E-3E-MSA21. Se presentan los resultados en la figura 56.

Se diluyeron muestras de suero 100 veces y analizaron para determinar la presencia de anticuerpos de ratón anti-TNF56-PEG40 o anti-TNF56-PEG60. Se demostró la falta de inmunogenicidad para ambas moléculas. Se presentan los datos en la figura 57.

#### Ejemplo 60: Eficacia del nanocuerpo anti-TNF $\alpha$ . TNF60 (TNF60) en la prevención de poliartritis crónica

Se usaron líneas de ratón transgénico que portan y expresan un transgén del factor de necrosis tumoral humano modificado en 3' (hTNF-alfa, caquectina) como modelo para estudiar la eficacia de TNF60 (TNF60) para prevenir el desarrollo de artritis (EMBO J. 10, 4025-4031). Se ha mostrado que estos ratones desarrollan poliartritis crónica con el 100% de incidencia a las cuatro a siete semanas de edad.

A partir de la tercera semana de edad, las crías de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales.

Antes de iniciarse el estudio, se calculó el peso corporal promedio para cada grupo. A partir de este momento, durante todo el estudio con animales se registraron los pesos una vez a la semana para cada grupo.

5 Para someter a prueba la eficacia de TNF60 en la prevención de poliartritis crónica, se realizaron inyecciones intraperitoneales dos veces a la semana en cada animal de un grupo particular según el siguiente esquema:

- Grupo 1 (control negativo): solución salina tamponada con fosfato (PBS) (tampón de formulación)

10 - Grupo 2 (Tratamiento con nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 30 mg/kg

- Grupo 3 (Tratamiento con nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg

- Grupo 4 (Tratamiento con nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 3 mg/kg

15 - Grupo 5 (1<sup>er</sup> control positivo): Enbrel a una dosis final de 30 mg/kg

- Grupo 6 (1<sup>er</sup> control positivo): Enbrel a una dosis final de 10 mg/kg

20 - Grupo 7 (2<sup>o</sup> control positivo): Remicade a una dosis final de 30 mg/kg

- Grupo 8 (2<sup>o</sup> control positivo): Remicade a una dosis final de 10 mg/kg

- Grupo 9 (2<sup>o</sup> control positivo): Remicade a una dosis final de 3 mg/kg

25 Para cada grupo, se anotaron las fechas de inyección y los volúmenes de inyección.

Las inyecciones continuaron durante siete semanas. Durante este periodo, se registraron las puntuaciones clínicas mediante la observación de cambios macroscópicos en la morfología de las articulaciones para cada animal.

30 A las 10 semanas, todos los ratones se sacrificaron y se recogieron sueros y articulaciones. Los sueros se almacenaron a -70°C y las articulaciones del tobillo se conservaron en formalina.

35 Para los grupos seleccionados, las articulaciones del tobillo se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Las secciones de las articulaciones del tobillo se usaron posteriormente para la evaluación histopatológica de la progresión de la enfermedad.

Se representan los resultados en la figura 58.

40 Ejemplo 61: Eficacia del nanocuerpo anti-TNF $\alpha$  TNF60 (TNF60) en el tratamiento terapéutico de poliartritis crónica

Se usaron líneas de ratón transgénico que portan y expresan un transgén del factor de necrosis tumoral humano modificado en 3' (hTNF-alfa, caquectina) como modelo para estudiar la eficacia de TNF60 (TNF60) en el tratamiento terapéutico de artritis (EMBO J. 10, 4025-4031). Se ha mostrado que estos ratones desarrollan poliartritis crónica con el 100% de incidencia a las cuatro a siete semanas de edad.

45 A partir de la sexta semana de edad, las crías de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de iniciarse el estudio, se calculó el peso corporal promedio para cada grupo. A partir de este momento, durante todo el estudio con animales se registraron los pesos una vez a la semana para cada grupo.

50 Para someter a prueba la eficacia de TNF60 en el tratamiento terapéutico de poliartritis crónica, se realizaron inyecciones intraperitoneales dos veces a la semana de cada animal de un grupo particular según el siguiente esquema:

55 - Grupo 1 (control negativo): solución salina tamponada con fosfato (PBS) (tampón de formulación)

- Grupo 2 (Tratamiento con nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 30 mg/kg

- Grupo 3 (Tratamiento con nanocuerpo): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg

60 - Grupo 4 (1<sup>er</sup> control positivo): Enbrel a una dosis final de 30 mg/kg

- Grupo 5 (2<sup>o</sup> control positivo): Remicade a una dosis final de 30 mg/kg

65 Para cada grupo, se anotaron las fechas de inyección y los volúmenes de inyección.

Las inyecciones continuaron durante siete semanas. Durante este periodo, se registraron las puntuaciones clínicas

mediante la observación de cambios macroscópicos en la morfología de las articulaciones para cada animal.

A las 13 semanas, todos los ratones se sacrificaron y se recogieron sueros y articulaciones. Los sueros se almacenaron a -70°C y las articulaciones del tobillo se conservaron en formalina.

5 Para los grupos seleccionados, las articulaciones del tobillo se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Las secciones de las articulaciones del tobillo se usaron posteriormente para la evaluación histopatológica de la progresión de la enfermedad.

10 Se representan los resultados en la figura 59.

Ejemplo 62: Efecto del formateo sobre la eficacia de un nanocuerpo anti-TNF- $\alpha$  en la prevención de poliartritis crónica

15 Se usaron líneas de ratón transgénico que portan y expresan un transgén del factor de necrosis tumoral humano modificado en 3' (hTNF-alfa, caquectina) como modelo para estudiar la eficacia de un nanocuerpo anti-TNF- $\alpha$  formateado de diferentes maneras en la prevención de poliartritis crónica (EMBO J. 10, 4025-4031). Se ha mostrado que estos ratones desarrollan poliartritis crónica con el 100% de incidencia a las cuatro a siete semanas de edad.

20 A partir de la tercera semana de edad, las crías de ratones transgénicos se dividieron en grupos de ocho animales. Antes de iniciarse el estudio, se calculó el peso corporal promedio para cada grupo. A partir de este momento, durante todo el estudio con animales se registraron los pesos una vez a la semana para cada grupo.

25 Para estudiar la eficacia de un nanocuerpo anti-TNF- $\alpha$  en diferentes formatos para la prevención de poliartritis crónica, se realizaron inyecciones intraperitoneales dos veces a la semana de cada animal de un grupo particular según el siguiente esquema:

- Grupo 1 (control negativo): solución salina tamponada con fosfato (PBS) (tampón de formulación)
- Grupo 2 (Formato de nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 10 mg/kg
- Grupo 3 (Formato de nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 2,5 mg/kg
- Grupo 4 (Formato de nanocuerpo 1): TNF60 a una dosis final de 1 mg/kg
- Grupo 5 (Formato de nanocuerpo 2): TNF56-PEG40 a una dosis final de 10 mg/kg
- Grupo 6 (Formato de nanocuerpo 2): TNF56-PEG40 a una dosis final de 1,8 mg/kg
- Grupo 7 (Formato de nanocuerpo 2): TNF56-PEG40 a una dosis final de 0,7 mg/kg
- Grupo 8 (Formato de nanocuerpo 3): TNF56-biot a una dosis final de 1,8 mg/kg
- Grupo 9 (Formato de nanocuerpo 4): TNF30 a una dosis final de 1 mg/kg
- Grupo 10 (Formato de nanocuerpo 5): TNF1 a una dosis final de 1 mg/kg
- Grupo 11 (1<sup>er</sup> control positivo): Enbrel a una dosis final de 10 mg/kg
- Grupo 12 (2<sup>o</sup> control positivo): Remicade a una dosis final de 10 mg/kg

50 Para cada grupo, se anotaron las fechas de inyección y los volúmenes de inyección.

Las inyecciones continuaron durante siete semanas. Durante este periodo, se registraron las puntuaciones clínicas mediante la observación de cambios macroscópicos en la morfología de las articulaciones para cada animal.

55 A las 10 semanas, todos los ratones se sacrificaron y se recogieron sueros y articulaciones. Los sueros se almacenaron a -70°C y las articulaciones del tobillo se conservaron en formalina.

60 Para los grupos seleccionados, las articulaciones del tobillo se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Las secciones de las articulaciones del tobillo se usaron posteriormente para la evaluación histopatológica de la progresión de la enfermedad.

Se representan los resultados en la figura 60.

65 Ejemplo 63: Estudio farmacocinético de nanocuerpos anti-TNF- $\alpha$  TNF60 (TNF60) y TNFS6-PEG40 en mono rhesus

Se usan monos rhesus (*Macaca mulatta*) criados en cautividad para determinar el perfil farmacocinético de TNF60 y TNF56-PEG40.

5 Se usan dieciséis animales en este estudio (ocho machos y ocho hembras) y se dividen en cuatro grupos (dos machos y dos hembras por grupo). Todos los animales pesaban aproximadamente 5 kg y están libres de enfermedad durante al menos seis semanas antes de usarse. Sniff® Pri vegetarisch V3994 sirve como alimento. Se ofrecen sesenta g/kg de p.c. a cada mono. El residuo se retira. A intervalos regulares (al menos dos veces al año) se analiza el alimento basándose en EPA/USA para detectar contaminantes mediante LUFA-ITL. Se ofrece agua corriente a voluntad. Los animales de cada grupo de tratamiento se alojan en un bloque de varias jaulas adyacentes dentro de la unidad de los monos. Los monos se mantienen de forma individual en jaulas de acero V2A con un tamaño de 90 cm x 82 cm x 96 cm. La temperatura ambiente se mantiene a 23°C ± 3°C (intervalo máximo) y la humedad relativa al 60% ± 20% (intervalo máximo). Las desviaciones del intervalo máximo provocadas, por ejemplo, durante el procedimiento de limpieza se tratan con los SOP. Las salas se iluminan y dejan en oscuridad durante periodos de 12 horas cada uno.

15 Dos grupos se infunden con TNF60 y dos grupos se infunden con TNF56-PEG40. Las infusiones intravenosas de TNF60 y TNF56-PEG40 (disueltos en PBS) en la vena cefálica del brazo derecho o izquierdo mediante catéteres permanentes y una bomba de infusión de TSE (véase a continuación) se administran a una dosis fija de 2 mg/kg.

20 Se realizan cuatro administraciones únicas separadas por un periodo de lavado de al menos catorce días. Después de la última administración, el periodo de seguimiento es al menos de ocho semanas. Dos de los cuatro grupos se tratan con TNF60 o TNF56-PEG40 en combinación con metotrexato (MTX) (disuelto en PBS). El grupo 2 se trata con TNF60 y MTX; el grupo 4 se trata con TNF56-PEG40 y MTX. MTX se dosifica de forma semanal por vía intramuscular a razón de 0,2 mg/kg. En los días de administración, MTX se aplica aproximadamente 30 minutos antes de la administración. La dosificación comienza en la primera administración del nanocuerpo y continuará a lo largo de las ocho semanas de lavado después de la cuarta dosis. Existen catorce administraciones de MTX individuales, separadas por un periodo de lavado de al menos una semana a partir de la primera administración del artículo de ensayo.

#### Ejemplo 64: Estudios de fibroblastos derivados del sinovio

30 En este estudio se evaluó la capacidad de los productos biológicos anti-TNF, ALX0071 y etanercept, para atenuar la producción de IL-6 inducida por TNF- $\alpha$  por fibroblastos derivados de sinovio con AR.

#### *Aislamiento de fibroblastos sinoviales*

35 El tejido articular sinovial de pacientes con AR que dieron su consentimiento se almacenó en medio basado en DMEM con antibióticos a 4°C durante hasta 96 horas después de la cirugía de artroplastia. Las células sinoviales se aislaron de sinovio disecado mediante digestión con colagenasa a 37°C durante 2 horas. La suspensión celular resultante se lavó entonces con una serie de etapas de centrifugación y resuspensión y luego se cultivaron las células resultantes a 37°C en medio de cultivo basado en DMEM complementado con FCS al 10% (v/v). Los fibroblastos resultantes se usaron para el siguiente experimento en el segundo o tercer pase. Las células de cuatro donantes se usaron en experimentos individuales. Los fibroblastos se sembraron en placas de poliestireno de parte inferior plana de 96 pocillos a razón de 1,5 x10<sup>4</sup> células en un volumen final de 250  $\mu$ l de medio de cultivo basado en DMEM complementado con FCS al 10% (v/v) por pocillo y se cultivaron durante la noche.

#### *Estimulación de fibroblastos sinoviales*

45 Entonces se incubaron las células durante 72 horas en medio de cultivo basado en DMEM complementado con TNF- $\alpha$  a razón de 50 ng por ml (3 nM (R&D Systems 210-TA/CF) solo o en presencia de dosis crecientes de ALX0071 (de 0,575 a 1920 ng por ml; de 0,015 a 50 nM) o etanercept (Wyeth Labs; de 3,75 a 11250 ng por ml; de 0,025 a 75 nM). El volumen final en cada pocillo fue de 250  $\mu$ l y cada evaluación se realizó por triplicado. Después de 72 horas, se retiró el medio sobrenadante y se almacenó a -40°C antes del análisis mediante ELISA para IL-6 (R&D Systems). Se determinó la inhibición de la producción de IL-6 inducida por TNF- $\alpha$  y se calcularon los valores de IC<sub>50</sub> para ALX0071 y etanercept.

#### *Resumen de resultados*

55 Tanto ALX0071 como etanercept redujeron de forma dependiente de la dosis la producción de IL-6 inducida por TNF- $\alpha$  por fibroblastos derivados de sinovio con AR de los cuatro donantes. Hubo una potencia similar entre los dos reactivos en estas condiciones de ensayo.

#### Ejemplo 65: Estudios de bolsa de aire murina

60 En este estudio se evaluó la capacidad de los productos biológicos anti-TNF, ALX0071 y etanercept, de atenuar la infiltración celular inducida por TNF- $\alpha$  en una bolsa de aire murina.

65



*Creación de bolsa de aire*

5 Las bolsas de aire se formaron mediante la inyección subcutánea (s.c.) de 2,5 ml de aire estéril en la superficie dorsal de ratones C57B1/6/J macho anestesiados (25-30 g, Harlan). La bolsa se volvió a inflar mediante la inyección de 2,5 ml de aire estéril 3 días después.

*Estimulación de TNF- $\alpha$*

10 Seis días después de la creación inicial de la bolsa de aire, se anestesiaron los animales y se le inyectó a la bolsa 1 ml del vehículo de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% que contiene 0,1  $\mu$ g de TNF- $\alpha$  recombinante humano (R & D Systems, 210-TA-050/CF). En otros tres grupos de animales, se inyectó por vía s.c. ALX0071 (0,0625, 0,125 y 0,25 mg/kg) 19 horas antes de la inyección de TNF- $\alpha$ . Se les inyectaron a unos tres segundos grupos de animales (s.c.) etanercept (Wyeth Labs, 0,125, 0,25 y 0,5 mg/kg) inmediatamente antes de la inyección de TNF- $\alpha$ .

15 24 horas después de la inyección de TNF- $\alpha$ , se sacrificaron los ratones con una concentración creciente de CO<sub>2</sub>. Las bolsas se lavaron con 2 ml de PBS estéril libre de endotoxinas que contiene 5 UI/ml de heparina. Los volúmenes se registraron y se separaron alícuotas de 0,5 ml para el recuento de la población total de leucocitos (WBC) en un contador de células Sysmex XT-Vet. Se calcularon la media y el error convencional de la media (SEM) de los recuentos de WBC totales para cada grupo por ml de fluido de lavado extraído. El análisis estadístico fue ,mediante ANOVA con prueba de Kruskal-Wallis posterior con los datos no transformados.

20

*Resumen de resultados*

25 Tanto ALX0071 como etanercept atenuaron la infiltración de WBC inducida por TNF- $\alpha$  en las bolsas de aire (tabla). Si bien esta atenuación alcanzó un significación estadística en ambos grupos de dosis de ALX0071 0,125 (P<0,01) y 0,25 mg/kg (P<0,05), no se observó significación estadística con ningún grupo de dosis de etanercept.

Tabla 8

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
PMP1C2 (TNF1)	52	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
PMP1G11	53	QVQLQESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFDGVSWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS

ES 2 778 123 T3

PMP1H6	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDPSVSWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLIPEDTA LYYCARSFSGSFRGQGTQVTVSS
PMP1G5 (TNF2)	55	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
PMP1H2	56	QVKLEESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSDYSGYTYTVGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLE PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
PMP3G2	57	AVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSOYSGYTYTVGWFRQAP GKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLE PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
PMP1D2	58	AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGK EREFVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNKNTVDLLMNSLKPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVEAYNYWGQGTQVTVSS
PMP3D10	59	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFTGYMFWFRQAPGKERQ LLASISWRGDNYYKESVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNLSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTNWGQGTQVTVSS
PMP5F10 (TNF3)	60	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYMFWFRQAPGKERE LLGNISWRGNYIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
PMP6A8 (ALB2)	61	AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDLNLMGWYRQPGNERE LVATCITVG.DSTNYADSVKGRFTISM DYTKQTVYLHMNSLRPEDT GLYYCKIRRTWHSSELWGQGTQVTVSS
PMP6B4	62	EVQLVESGGGLVQEGGSLRLACAASERIWQINLLGWYRQPGNERE LVATITVG.DSTSYADSVKGRFTISR DYDKNTLYLQMNLSLRPEDTG LYYCKIRRTWHSSELWGQGTQVTVSS
PMP6A6 (ALB1)	63	AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTA VYYCTIGGSLRSRSGQGTQVTVSS
PMP6C1	64	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFGMSWVRQYPGKEPE WVSSINGRGGDDTRYADSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTA EYYCTIGRSVRSRRTQGTQVTVSS
PMP6G8	65	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKDQE WVSAISADSDKRYADSVKGRFTISRDNAKMLYLEMNSLKPEDTA VYYCVIGRGSPPSPGTQVTVSS
PMP6A5	66	QVQLAESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFGSFGMSWVRQAPGEGLE WVSAISADSDKRYADSVKGRFTISRDNAKMLYLEMNSLKSEDTA VYYCVIGRGSPPASQGTQVTVSS
PMP6G7	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFSNYWYWVRVAPGKGLE RISRDISTGGGYSYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDT ALYYCAKDREAQVDTLDFDYRGQGTQVTVSS
NC55TNF_S1C4	105	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASQIIFGSHVAWFRQAPGRERE FVAEIRPSGDFGPEGEFEHVTA SLKGRFTIAKNSVDNTVYLOMNSL KPEDTAVYYCAAAPYRGRDRYRWEY EYEWGQGTQVTV
NC55TNF_S1C3	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKNAGSTSNAYATGWFRRAPGKERE FVAGIQWSSGDAFYRNSVKGRFRITRDPDNTVYLOMNDLKPEDTAI YYCAQKLSFYYNDFDSSNYEYWGQGTQVTV
NC55TNF_S2C1	107	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAVSQGLFSTNDVGVYRRAPGKQRE LVATITDDGTTDYGDDVKGRFVISREGENVYLEMNSLKPEDTAVYY CNINRLRSTWGI RYDVWGQGTQVTVSS

NC55THF_S2C5	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSQFTFSTTSMTWVRQAPGKFE WVSFINS DGSSTTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSKPEDTA MYYCGRRGYGRDRSKGIQVTVAS
NC55TNF_S3C7	109	EVQLVESGGGTVQAGDSLRLSCAASGRSPSSVAMGWFRQAPGKQRE FLAGVGYDGSIRYAESVKGRFTIARGNRESTVFLQMNLSKPEDTA VYFCTAEPIGAYEGLWTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S3C1	110	XXXXVESGGGLMQPGGSLKLSCAASGFMFSDSAMGWFRQAPGKERE FVATISWNGGSSSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNGLTPQDTA IYYCAGSYSNCPHRFSQYQYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1B2	111	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGTYAMGWFRQAPGKERE FVAAISWGGGSIYVAESAKGRFTISRDNAKXTMYLQMDLSKPEDTA VYYCAAANNIATLRQGSWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1D2	112	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRNFVITYAMSWFRAPGKERE FVASISWGGOTTYYSNSVKGRFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTA DYCAVQVQIDPSWSGVNLDYDYLGGSGTQVTVSS
NC55TNF_BMP1E2	113	EVQLVESGGRLVQPGGSLRLSCKNAGSTSNAYATGWFRAPGKERE FVAGIQWGGDAFYRNSVKGRFRI TRDPDNTVYLQMNLSKPEDTAI YYCAQKLSPIYNDFDSSNYEYWGQGTQVTVSS
NC55TKF_BMP1G2	114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASATISSIVMLGWYRQAPGKQRE WVASITIGSRTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAV YFCNAVPPRDDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2A2	115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGQTSSSYDMGWFRQAPGEGRE FVARISGSDGSTYYSRDRKDRFTISRDNKNTVYLQMDRLKPDDTA VYYCRVPRYENQWSSYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2C2	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSTYDMSWVRQAPGKGLE WVSGIDSGGSPMYVDSVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNLSKPEDTA VYYCAKFTGADGGSWYNSYGMDSWNGKGTQVTVSS
NC55TNF_BMP2F2	117	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASERSNRYNMAWFRQAPGKERE FLARVDVSGGNTLYGDSVKDRFTVSRINGKNAMYLQMNLSKPEDTA IYYCAAGGWGTTQYDYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC10	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCSVSSGCTFSAYSMTWVRQAPGKA EEWVSFINS DGSSTTYADSVNGRFKISRDNAKNTLYLQMNLSGPE TAMYYCQRGGYALDRGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC11	119	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCASSGRGFYKNAMGWFRQPPGKERE FVASIKWNGNNTTYADSVRGRFTISRGNKNTENTVSLQMNLSKPE DTADYYCAADSSHSYVYSKAYEYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC1	120	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVFSGFAPSSAMWVRQAPGKYEE WVSFINS DGSSTTYADSVQGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSKSEDTA MYYCGRRGYGRDRSQGIQVTVSS
NC55TNF_NC2	121	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE FVAAISWSGTITNYADSVKGRFTISRDNKNTVHLQMNLSKPEDTA VYHCAVQPYSGDYTYGVEEYDYWGXTQVTVSS
NC55TNF_NC3	122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSQFTFSAATSMWVRQAPGKAAE WVSFINS DGSSTTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDLQSEDTA MYYCGRRGYGRDRSRGIQVTVSS
NC55TNF_NC5	123	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGAFSNYDVGWFRQAPGEGRE IVARISGSDSTYSSNRAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKREDTA VYYCRAARYNGTWSNDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC6	124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCECVSSGCTFSAYSMTWVRQAPGKA EEFVSFINS DGSSTTYANSVNGRFKISRDNAKNTLYLQMNLSGPE TAMYYCQRGGYALDRGQGTQVTVSS

NC55TNF_NC7	125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQNTVYLQMDSLKPETA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC8	126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCVVSGFTFSTTSMTWVRQAPGKFE WVSFINS DGSSTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPETA MYYCGRRGYGRDRSKGIQVTVSS
NC55TNF_S2C2	127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCVASASGVKVN DMGWYRQAPGKERE LVATITDDGRNTYEDFAKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLPEAV YYCNARTYWAHLPTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S1C6	128	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRSFGSVAMGWFRQAPGKERE FVAAIGYDGNSTRYGDSVKGRFTISRDNKNTMYLEMENLNADDTA RYLCAAEPLARYEGLWTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S3C2	129	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCTTSTRTNDRENMWAFHQAPGKDRE FVSRIDVAGYNTAYGDFVKGRFTVSRDSAENTVVLQMNLSLPEDTG VYYCAAGGWIQSQSDYDLWGQGTQVTVSS

Tabla 9

Nanocuerpo	Clase	Koff estimada (1/s)
PMP5 F10	III	2,63E-04
PMP1 G5	II	3,59E-04
PMP1 C2	I	4,39E-04
PMP1 G11	I	1,15E-03
PMP1 H6	I	2,14E-03
PMP1 H2	II	3,65E-03
PMP3 G2	II	1,09E-02

Tabla 10

Nanocuerpo	Secuencia de línea germinal	Diferencias de # AA / # AA totales	% de identidad de AA
ALB1	DP51/DP53	13/87	85.1
ALB2	DP54	26/87	70.2
TNF1	DP51/DP53	6/87	93.2
TNF2	DP54	16/87	81.7
TNF3	DP29	18/87	79.4

Tabla 11

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento (mg/l)
ALB1	corto/37°C	18
ALB2	corto/37°C	4
TNF1	corto/37°C	8.3
TNF2	corto/37°C	5
TNF3	corto/37°C	0.8

Tabla 12

ID	50% de unión	
	TNF- $\alpha$ humano	TNF- $\alpha$ rhesus
TNF1	12	12
TNF2	20	>3000
TNF3	18	16

Tabla 13

	50% de inhibición	
ID	TNF- $\alpha$ humano	TNF- $\alpha$ rhesus
TNF1	530	220
TNF2	3500	>5000
TNF3	100	100

Tabla 14

TNF- $\alpha$ humano	Kd (1/s)
TNF1	1.05E-03
TNF2	1.33E-03
TNF3	3.02E-04

Tabla 15

		Albúmina humana	Albúmina de rhesus	Albúmina de ratón
ALB1	KD (nM)	0,57	0,52	6,5
	ka (1/Ms)	1,11E+06	1,05E+06	1,11E+06
	kd (1/s)	6,30E-04	5,46E-04	7,25E-03
ALB2	KD (nM)	0,092	0,036	15,7
	ka (1/Ms)	8,15E+05	1,94E+06	1,95E+05
	kd (1/s)	7,52E-05	7,12E-05	3,07E-03

Tabla 16

ensayo: L929s + Act D (5000c/w)

TNF: TNF $\alpha$  humano @ 0.5ng/ml

		EC <sub>50</sub> en nM			potencia relativa	
		media	desv. est.	#	media	desv. est.
TNF1	1C2	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF2	1G5	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF3	5F10	0.224	0.133	14	0.048	0.019
Enbrel		0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira		0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade		0.083	0.037	45	0.103	0.058

ensayo: L929s + Act D (5000c/w)

TNF: TNF $\alpha$  rhesus @ 0.5ng/ml

		EC <sub>50</sub> en nM			potencia relativa	
		media	desv. est.	#	media	desv. est.
TNF1	1C2	0.693	0.305	9	0.015	0.009
TNF2	1G5	>50		9		
TNF3	5F10	0.602	0.283	9	0.017	0.010
Enbrel		0.009	0.003	7	1	0.000
Humira		0.071	0.025	8	0.103	0.059
Remicade		>6.7		7		

Tabla 17

%	No tratado	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF1	100	98	98	198	98	95	92	90
TNF2	100	99	100	99	197	96	63	50
TNF3	100	96	97	98	96	94	75	70
ALB1	100	101	102	101	100	64	94	90
ALB2	100	100	102	100	100	28	8	17



Tabla 18

nanocuerpo	temp. en °C	EC <sub>50</sub> en nM	#	potencia relativa
TNF1	control	0.916	1	0.013
92#2302nr1.TNF1	RT	0.873	1	0.014
	37	0.901	1	0.013
	50	0.908	1	0.013
	60	0.891	1	0.013
	70	1.218	1	0.010
	80	2.655	1	0.004
	90	5.797	1	0.002
TNF2	control	2.500	1	0.005
92#2302nr1.TNF2	RT	2.165	1	0.005
	37	2.212	1	0.005
	50	2.241	1	0,005
	60	1.782	1	0,007
	70	2.487	1	0,005
	80	2.818	1	0,004
	90	6.135	1	0,002
TNF3	control	0.278	1	0.043
92#2302nr1.TNF3	RT	0.289	1	0.041
	37	0.295	1	0.040
	50	0,290	1	0.041
	60	0.281	1	0.042
	70	0.293	1	0.040
	80	0.576	1	0.021
	90	0.861	1	0.014

Tabla 19

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
GS9	68	GGGGSGGGG
GS30	69	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
TNF1-GS9-TNF1 (TNF4)	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGQVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARSPSGFNRG QGTQVTVSS
TNF2-GS9-TNF2 (TNF5)	71	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF3-GS9-TNF3 (TNF6)	72	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYMGWFRQAPGKERELLGNIS WRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF1-GS30-TNF1 (TNF7)	73	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF2-GS30-TNF2 (TNF8)	14	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKEREVARIYWSSGLTYADSVK RFTISRDIKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYN YWGQGTQVTVSS
TNF3-GS30-TNF3 (TNF9)	75	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSNYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASAGRSLSN YMGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKN TIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF30-30GS-TNF30-C (TNF55)	419	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSggggsgggsgggsgggsgggsggg gggggggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSC
TNF30-30GS-TNF30-gggC (TNF56)	420	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSggggsgggsgggsgggsgggsggg gggggggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSgggC

Tabla 20

<b>ID</b>	<b>Formato</b>	<b>Ligador</b>
TNF4	TNF1-TNF1	9 AA GlySer
TNF5	TNF2-TNF2	9 AA GlySer
TNF6	TNF3-TNF3	9 AA GlySer
TNF7	TNF1-TNF1	30 AA GlySer
TNF8	TNF2-TNF2	30 AA GlySer
TNF9	TNF3-TNF3	30 AA GlySer

Tabla 21

<b>Nanobody™</b>	<b>Tiempo de inducción</b>	<b>Rendimiento</b>
TNF4	ON/28°C	3.2
TNF5	corto/37°C	5.5
TNF6	corto/37°C	1.19
TNF7	ON/28°C	2.7
TNF-8	corto/37°C	6.6
TNF9	ON/28°C	1.3

Tabla 22

	50% de inhibición (mg/ml)
ID	TNF $\alpha$ humano
TNF4	13
TNF5	6.3
TNF6	30
TNF7	16
TNF8	23
TNF9	18

Tabla 23

Ensayo: *L929s + Act D (5000c/w)*

TNF: *TNF- $\alpha$  humano @ 0.5ng/ml*

Nanocuerpo	EC <sub>50</sub> en nM		#	potencia relativa	
	media	desv. est.		media	desv. est.
TNF4	0.236	0.049	4	0.033	0.012
TNF5	0.020	0.010	9	0.566	0.275
TNF6	0.078	0.047	8	0.179	0.168
TNF7	0.013	0.005	8	0.673	0.211
TNF8	0.007	0.002	2	1.240	0.137
TNF9	0.012	0.005	6	0.729	0.242
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Ensayo: *L929s + Act D (5000c/w)*

TNF: *TNF- $\alpha$  de rhesus @ 0.5ng/ml*

Nanocuerpo	EC <sub>50</sub> en nM		#	potencia relativa	
	media	desv. est.		media	desv. est.
TNF4	0.141	0.025	4	0.065	0.015
TNF5	35.000	16.000	5	0.000	0.000
TNF6	0.398	0.074	6	0.024	0.003
TNF7	0.011	0.005	4	0.860	0.142
TNF8	1.026	0.444	2	0.010	0.001
TNF9	0.038	0.012	4	0.249	0.032
Enbrel	0.009	0.003	7	1.000	0.000
Humira	0.071	0.025	8	0.103	0.059
Remicade	>6.7		7		

Tabla 24

%	no tratado	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF4	100	99	99	99	98	55	34	17
TNF5	100	99	101	99	98	92	26	22
TNF6	100	103	104	103	105	99	7	7
TNF7	100	100	100	98	96	66	33	40
TNF8	100	99	100	99	100	89	11	8
TNF9	100	101	101	101	101	99	17	18

Tabla 25

Nombre	SEQID NO	Secuencia
TNF13 (TNF1 HUM1)	76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF14 (TNF1 HUM2)	77	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF15 (TNF2 HUM1)	78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF16 (TNF2 HUM2)	79	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TKF17 (TNF2 HUM3)	80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF18 (TNF2 HUM4)	81	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF19 (TNF2 HUM5)	82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRSVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF20 (TNF3 HUM1)	83	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF21 (TNF3 HUM2)	84	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF22 (TNF3 HUM3)	85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKTEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF23 (TNF3 HUM4)	86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
ALB3 (ALB1 HUM1)	87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB4 (ALB1 HUM2)	88	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPE WVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB5 (ALB1 HUM3)	89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS

Tabla 26

<b>Nanocuerpo</b>	<b>Tiempo de inducción</b>	<b>Rendimiento (mg/l)</b>
TNF13	ON/28°C	8.8
TNF14	ON/28°C	7
TNF15	<b>corto /37°C</b>	7.6
TNF16	<b>corto /37°C</b>	8.7
TNF17	<b>corto /37°C</b>	7.2
TNF18	<b>corto /37°C</b>	4.8
TNF19	<b>corto /37°C</b>	8
TNF20	ON/28°C	3.5
TNF21	ON/28°C	7.5
TNF22	ON/28°C	6
TNF2	ON/28°C	2.8
ALB3	ON/28°C	11.8
ALB4	ON/28°C	9
ALB5	ON/28°C	11.7



Tabla 27

<i>Ensayo: L929s + Act D (5000c/w)</i>					
<i>TNF : TNF-<math>\alpha</math> humano @ 0.5ng/ml</i>					
Nanocuerpo	EC <sub>50</sub> en nM		#	potencia relativa	
	media	desv. est.		media	desv. est.
<b>TNF1</b>	<b>0.707</b>	<b>0.265</b>	<b>14</b>	<b>0.015</b>	<b>0.007</b>
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
<b>TNF2</b>	<b>1.412</b>	<b>0.622</b>	<b>14</b>	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>
TNF15	1.669	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	1.898	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	3.023	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	1.508	0.481	4	0.004	0.001
TNF19	2.191	0.941	4	0.001	0.001
<b>TNF3</b>	<b>0.224</b>	<b>0.133</b>	<b>14</b>	<b>0.048</b>	<b>0.019</b>
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.044	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.044	0.011
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 28

<b>%</b>	<b>No tratado</b>	<b>RT</b>	<b>37C</b>	<b>50C</b>	<b>60C</b>	<b>70C</b>	<b>80C</b>	<b>90C</b>
<b>TNF13</b>	100	104	99	98	99	84	93	93
<b>TNF14</b>	100	98	101	95	99	96	99	90
<b>TNF15</b>	100	100	91	99	95	90	59	46
<b>TNF1</b>	100	97	102	101	94	101	58	48
<b>TNF17</b>	100	102	98	100	90	90	69	59
<b>TNF18</b>	100	100	101	97	91	93	63	50
<b>TNF19</b>	100	102	111	98	92	91	60	49
<b>TNF20</b>	100	94	93	93	93	92	85	67
<b>TNF21</b>	100	98	99	101	98	96	36	40
<b>TNF22</b>	100	102	101	105	99	93	25	31
<b>TNF23</b>	100	98	97	99	97	98	87	55
<b>ALB3</b>	100	100	99	98	25	18	60	62
<b>ALB4</b>	100	100	100	100	99	29	61	55
<b>ALB5</b>	100	100	100	99	94	32	61	48

Tabla 29

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
TNF1-9GS-ALB1-9GS-TNF1 (TNF24)	90	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYICARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQF GNSLRLSCAASGFTFRSPGMSWVRQAPGKEPEWVSSIISGSGSDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTALYICARSPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF2-9GS-TNF2-9GS-ALB1 (TNF25)	91	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKEREVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSPGMSWVRQAPGKEPE WVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
TNF3-9GS-ALB1-9GS-TNF3 (TNF26)	92	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNIWRGYNIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSPGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SGGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLSL SCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERELLGNIWRGYNIYKDSVKG RFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS

TNF1-30GS-THF1-9GS-ALB1 (TNF27)	93	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIG GSLRSSQGTQVTVSS
TNF3-30GS-TNF3-9GS-ALB1 (TNF28)	94	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGSGGGSEVQVVESGGGLVQAGGSLSLSCSASGRSLSN YYMGWFRQAPGKERELLLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKN TIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWV RQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQ NSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTQVTVSS
TNF30-9GS-ALB8-9GS-TNF30 (TNF60)	417	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRCQGLTVTVSSggggsggggEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTL ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSS QGTPLVTVSSggggsggggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMYWVRQAPGKLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS
TNF33-9GS-ALB8-9GS-TNF33 (TNF62)	418	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTPLVTVSSggggsggggEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLRSSQGTPLVTVSSggggsggggEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIIYKDSVKG RFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTY WGQGTPLVTVSS

Tabla 30

ID	Formato
TNF24	TNF1-9GS-ALB1-9GS-TNF1
TNF25	TNF2-9GS-TNF2-9GS-ALB1
TNF26	TNF3-96S-ALB1-9GS-TNF3
TNP27	TNF1-30GS-TNF1-9GS-ALB1
TNF28	TNF3-30GS-TNF3-9GS-ALB1

Tabla 31

Nanocuerpo	Tiempo de inducción	Rendimiento
TNF24	ON/28°C	1.7
TNF25	corto /37°C	0.445
TNF26	corto /37°C	0.167
TNF27	ON/28°C	2.2
TNF28	corto/37°C	1

Tabla 32

<b>Ejemplo:</b> L929s + Act D (5000c/w)					
<b>TNF :</b> TNF- $\alpha$ humano @ 0.5ng/ml					
	EC <sub>50</sub> en Nm			potencia relativa	
Nanocuerpo	Media	desv. est.	#	Media	desv. est.,
TNF24	0.011	0.003	11	0.878	0.248
TNF25	0.018	0.008	14	0.603	0.243
TNF26	0.020	0.009	14	0.583	0.210
TNF27	0.012	0.003	3	0.810	0.037
TNF28	0.021	0.008	6	0.548	0.360
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 33

<b>Albúmina humana</b>	<b>KD (nM)</b>	<b>ka (1/Ms)</b>	<b>kd (1/s)</b>
6A6 (ALB1)	0,57	1,11E+6	6,30E-4
1C2-GS-6A6-GS-1C2 (TNF24)	11	2,26E+05	2.48E-03
1G5-GS-1G5-GS-6A6 (TNF25)	7,2	2,91E+05	2,10E-03
5F10-GS-6A6-GS-5F10 (TNF26)	7,3	2,81E+05	2,05E-03
1C2-GS6-1C2-GS-6A6 (TNF27)	8,9	3,19E+05	2,84E-03
5F10-GS6-5F10-GS-6A6 (TNF28)	14	1,55E+05	2,13E-03

Tabla 34

<b>%</b>	<b>no tratado</b>	<b>RT</b>	<b>37C</b>	<b>50C</b>	<b>60C</b>	<b>70C</b>	<b>80C</b>	<b>90C</b>
<b>TNF24</b>	100	100	99	98	5	3	8	18
<b>TNF25</b>	100	nd	103	102	95	5	4	6
<b>TNF26</b>	100	109	115	112	107	10	8	10
<b>TNF27</b>	100	102	103	102	22	9	26	34
<b>TNF28</b>	100	97	99	99	66	3	6	10

Tabla 35

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
TNF29 (TNF1 HUM1)	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS
TNF30 (TNF1 HUM2)	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS
TNP31 (TNF2 HUM1)	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF32 (TNF2 HUM2)	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKGRFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLR PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGLTVTVSS
TNF33 (TNF3 HUM1)	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGRE LLGNI SWRGYNIYYKDSVKGRFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGLTVTVSS
ALB6 (ALB1 HUM1)	100	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
ALB7 (ALB1 HUM2)	101	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
ALB8 (ALB1 HUM3)	102	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
ALB9 (ALB1 HUM4)	103	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
ALB10 (ALB1 HUM5)	104	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS

Tabla 36

<b>Nanobody™</b>	<b>Tiempo de inducción</b>	<b>Rendimiento</b>
TNF29	ON/28C	2.1 mg/L
TNF30	ON/28C	2.7 mg/L
TNF31	ON/28C	2 mg/L
TNF32	ON/28C	1.5 mg/L
TNF33	ON/28C	0.5 mg/L

Tabla 37

**Ensayo:** *L929s + Act D (5000c/w)*

**TNF:** *TNF- $\alpha$  humano @ 0.5ng/ml*

<b>V<sub>HH</sub></b>	<b>EC<sub>50</sub> en nM</b>			<b>potencia relativa</b>	
	<b>media</b>	<b>desv. est.</b>	<b>#</b>	<b>media</b>	<b>desv. est.</b>
<b>TNF1</b>	<b>0.707</b>	<b>0.265</b>	<b>14</b>	<b>0.015</b>	<b>0.007</b>
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
TNF29	1.336		1	0.013	
TNF30	0.985		1	0.017	
<b>TNF2</b>	<b>1.412</b>	<b>0.622</b>	<b>14</b>	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>



TNF15	5.896	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	2.422	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	7.555	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	3.134	0.481	4	0.004	0.001
TNF19	7.372	0.941	4	0.001	0.001
TNF31	2.195		1	0.008	
TNF32	2.506		1	0.007	
<b>TNF3</b>	<b>0.224</b>	<b>0.133</b>	<b>14</b>	<b>0.048</b>	<b>0.019</b>
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.004	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.04	0.011
TNF33	0.3		1	0.057	
Enbrel	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade	0.083	0.037	45	0.103	0.058

Tabla 38

	<b>no tratado</b>	<b>RT</b>	<b>37C</b>	<b>50C</b>	<b>60C</b>	<b>70C</b>	<b>80C</b>	<b>90C</b>
<b>TNF29</b>	100	100	100	100	100	96	91	89
<b>TNF30</b>	100	100	100	99	100	96	92	8
<b>TNF31</b>	100	100	100	98	91	84	56	43
<b>TNF32</b>	100	99	98	97	87	78	45	39
<b>TNF33</b>	100	98	97	97	94	91	79	49

Tabla 39

<b>Ensayo:</b> <i>alphaKYM (10000c/w)</i>	
<b>TNF :</b> <i>TNF-<math>\alpha</math> humano @ 1ng/ml</i>	
<b>Nanocuerpo</b>	<b>EC<sub>50</sub> en nM</b>
TNF1	2.466
TNF2	4.236
TNF3	<b>0.655</b>
TNF4	0.069
TNF5	0.008
TNF6	0.121
TNF7	0.009
TNF8	0.013
TNF9	0.020
Enbrel	0.040
Humira	0.103
<b>Remicade</b>	<b>0.100</b>

<b>Resultados de WO 04/41862</b>		
<b>Nanocuerpo</b>	<b>SEQ ID No</b>	<b>EC<sub>50</sub> en nM</b>
1A	1	100
3E	4	12
3G	5	20
<b>Remicade</b>		<b>0,080</b>

Tabla 40

<u>M13 rev</u>	SEQ ID NO: 421	<u>GGATAACAATTTCACACAGG</u>
<u>Rev 9GlySer L108</u>	SEQ ID NO: 422	<u>TCAGTAACCTGGATCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCAG</u>
<u>For GS/ Short</u>	SEQ ID NO: 423	<u>AGGTTACTGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGG</u>
<u>Rev 15BspEI L108</u>	SEQ ID NO: 424	<u>TCAGTAACCTTCCGGAACCGCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACAAG</u>
<u>For BspEI</u>	SEQ ID NO: 425	<u>AGGTTACTGATCCGGAGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG</u>
<u>M13 for</u>	SEQ ID NO: 426	<u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u>

Tabla 41

<b>Cebador inverso</b>		<b>Secuencia</b>
PiRevhumNot/a40c (Not1)	SEQ ID NO: 427	ATGGTGGTGTGCGGCCGCCTATTATGAGGAGACGGTGACCAGG
<b>Cebador directo</b>		
Pi2for (Xho1)	SEQ ID NO: 428	AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

Tabla 42

<b>TNF-<math>\alpha</math> humano</b>	<b>EC<sub>50</sub> en nM</b>		
<b>VHH</b>	<b>medio</b>	<b>desv. est.</b>	<b>Número de ensayos</b>
TNF60	0.010	0.002	6
Enbrel	0.014	0.009	33
Humira	0.141	0.074	33
Remicade	0.120	0.037	33

Tabla 43

		<b>Albúmina humana</b>	<b>Albúmina de rhesus</b>
<b>TNF60</b>	K <sub>D</sub> (nM)	<b>24,4</b>	<b>24,1</b>
	k <sub>on</sub> (1/Ms)	2,05E+05	2,09E+05
	k <sub>off</sub> (1/s)	5,02E-03	5,04E-03
<b>TNF24</b>	K <sub>D</sub> (nM)	<b>11</b>	Nd
	k <sub>on</sub> (1/Ms)	2.26E+05	Nd
	k <sub>off</sub> (1/s)	2.48E-03	Nd

Tabla 44

PiForLong	SEQ ID NO: 429	GCTAAAGAAAGAAGGGG TATCTCTCGAGAAAAGAGAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGG
Rev_30GlySer_L108	SEQ ID NO: 430	TCAGTAACTGGATCCCGCCACGGCTGCCTCCACCTGCCGCTACCCCGCCDCGCG TGCCTCACCCCTCGAGGAGAGCGGTGACAG
For_GlySer	SEQ ID NO: 431	AGGTTACTGAGGATCCGGCGGGTGGAGGCAGCGGTGGCGGGGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
PiRevCys1hum	SEQ ID NO: 432	ATGGTGGTGTGAATTC TTATTAGCAGGAGACGGTGACAAGG
PiRevCys2hum	SEQ ID NO: 433	ATGGTGGTGTGAATTC TTATTAGCAACCTCCACCTGAGGAGACGGTGACAAGG
AOXIFor	SEQ ID NO: 434	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
AOXIRev	SEQ ID NO: 435	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Tabla 45

<b><i>TNF-<math>\alpha</math> humano</i></b>	<b>EC<sub>50</sub> en nM</b>		<b>Número de ensayos</b>
	<b>media</b>	<b>desv. est.</b>	
VHH			
TNF1	0.748	0.153	27
TNF55-PEG40	0.004	0.001	8
TNF55-PEG60	0.004	0.002	6
TNF55-Biotina	0.012	0.003	5
TNF56-PEG40	0.006	0.003	57
TNF56-PEG60	0.005	0.003	7
TNF56-Biotina	0.017	0.009	13
Enbrel	0.013	0.006	71
Humira	0.127	0.058	67
Remicade	0.144	0.061	67

Tabla 46

	<b>DS534 P4</b>	<b>DS592 P4</b>	<b>DS605 P3</b>	<b>KM05-179 P4</b>
<b>p[IC]50</b>				
<b>Etanercept</b>	9.55	9.49	9.51	9.51
<b>Accipiter</b>	9.88	9.44	9.37	9.27
<b>pM</b>				
<b>Etanercept</b>	282	324	309	309
<b>Accipiter</b>	132	363	427	537

Tabla 47

Grupo de dosis	Recuento de WBC total ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	
	ALX0071	Etanercept
Vehículo CMC	0.86 $\pm$ 0.09	
0.1 $\mu\text{g}$ de TNF- $\alpha$ humano	3.72 $\pm$ 0.21	
0.0625 mg/kg	3.03 $\pm$ 0.6	-
0.125 mg/kg	1.23 $\pm$ 0.3**	2.40 $\pm$ 0.39
0.25 mg/kg	1.37 $\pm$ 0.17*	2.47 $\pm$ 0.54
0.5 mg/kg	-	2.19 $\pm$ 0.10
*P<0.05, **P<0.01 contra 0.1 $\mu\text{g}$ de TNF- $\alpha$ humano		

5 **Lista de secuencias**

<110> Ablynx N.V.

<120> Nanocuerpos mejorados contra el factor de necrosis tumoral alfa

10

<130> ABL-027-PCT

<140> PCT/EP2006/004678

<140> 18-5-2006

15

<160> 476

<110> PatentIn version 3.3

20

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11) .. (11)

<223> Residuo distintivo

30

<400> 1

ES 2 778 123 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 20 25

5 <210> 2  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <223>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Residuo distintivo

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(10)  
 <223> Residuo distintivo

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Residuo distintivo

<400> 2

25 Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val Ala  
 1 5 10

30 <210> 3  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR3

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(22)  
 <223> Residuo distintivo

40 <400> 3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

45 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> elemento FR4

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)



<223> Residuo distintivo

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (6)..(6)  
 <223> Residuo distintivo

<400> 4

**Xaa Xaa Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser**  
 10 **1 5 10**

<210> 5  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR1

20 <400> 5

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

**Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly**  
 20 25

<210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> elemento FR2

30 <400> 6

**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala**  
 35 **1 5 10**

<210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> elemento FR2

<400> 7

45 **Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR2

55 <400> 8

ES 2 778 123 T3

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ala  
 1 5 10  
 <210> 9  
 <211> 14  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 10 <400> 9  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala  
 1 5 10  
 15 <210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento FR2  
 <400> 10  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala  
 25 1 5 10  
 <210> 11  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 35 <400> 11  
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ala  
 1 5 10  
 40 <210> 12  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> elemento FR3  
 <400> 12  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30  
 50 <210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>



<223> elemento CDR1  
 <400> 18

**Val Ser Trp Met Tyr**  
 5 1 5

<210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR1

15 <400> 19

**Ala His Ser Val Tyr Thr Met Gly**  
 1 5

<210> 20  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento CDR1

25 <400> 20

**Gly Tyr Tyr Met Gly**  
 1 5

30 <210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento CDR1

40 <400> 21

**Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly**  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 45 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR2

50 <400> 22

**Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys**  
 1 5 10 15

55 **Gly**

<210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT

ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>

<223> elemento CDR2

5

<400> 23

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

10

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> elemento CDR2

<400> 24

Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

20

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> elemento CDR2

30

<400> 25

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

35

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> elemento CDR2

<400> 26

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

45

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR2

5 <400> 27

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

10 <210> 28  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 28

Ser Ile Ser Trp Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Lys Glu Ser Val Lys  
1 5 10 15

20 Gly

<210> 29  
<211> 15  
<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR3

30 <400> 29

Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr  
1 5 10 15

35 <210> 30  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> elemento CDR3

<400> 30

Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
45 1 5 10

<210> 31  
<211> 15  
<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR3

55 <400> 31

ES 2 778 123 T3

**Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ala Tyr Asn Tyr**  
**1 5 10 15**

5 <210> 32  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 32

**Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn**  
**1 5 10**

15 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 33

25 **Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr**  
**1 5 10 15**

30 <210> 34  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 34

**Ser Pro Ser Gly Phe Asn**  
**1 5**

40 <210> 35  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 35

**Ser Pro Ser Gly Ser Phe**  
**1 5**

50 <210> 36  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR1

60 <400> 36

**Ser Phe Gly Met Ser**  
 1 5

5 <210> 37  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <400> 37

**Leu Asn Leu Met Gly**  
 1 5

15 <210> 38  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento CDR1

<400> 38

**Ile Asn Leu Leu Gly**  
 1 5

25 <210> 39  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> elemento CDR1

<400> 39

**Asn Tyr Trp Met Tyr**  
 1 5

40 <210> 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento CDR2

<400> 40

**Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
 1 5 10 15

**Gly**

50 <210> 41  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> elemento CDR2

<400> 41



ES 2 778 123 T3

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 1 5 10 15  
 5 <210> 42  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> elemento CDR2  
 <400> 42  
 Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 1 5 10 15  
 15 <210> 43  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 43  
 25 Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 30 <210> 44  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> elemento CDR2  
 <400> 44  
 Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 40 <210> 45  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 45  
 Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 50 Gly

5 <210> 46  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR2

10 <400> 46

**Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
 1 5 10 15

**Gly**

15 <210> 47  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 47

**Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr**  
 1 5 10

25 <210> 48  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 48

35 **Gly Gly Ser Leu Ser Arg**  
 1 5

40 <210> 49  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 49

**Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu**  
 1 5

50 <210> 50  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 50

Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser  
 1 5  
 <210> 51  
 5 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> elemento CDR3  
 <400> 51  
 Gly Arg Gly Ser Pro  
 1 5  
 15 <210> 52  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> nanocuerpo  
 <400> 52  
 25 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115  
 <210> 53  
 30 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

ES 2 778 123 T3

<223> nanocuerpo

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly Val Ser  
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Ser Phe Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

5 Val Ser Ser  
115

<210> 54

<211> 115

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> nanocuerpo

15 <400> 54

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

ES 2 778 123 T3

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Ser Phe Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 55  
<211> 129  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> nanocuerpo

10

<400> 55

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
115 120 125

Ser

15 <210> 56  
<211> 129  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 778 123 T3

<220>

<223> nanocuerpo

5 <400> 56

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr  
50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr  
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
100 105 110

Val Glu Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
115 120 125

Ser

10 <210> 57

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> nanocuerpo

<400> 57

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

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

ES 2 778 123 T3

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr  
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr  
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
 100 105 110

Val Glu Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 58  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> nanocuerpo

10

<400> 58

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

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

Ser Val Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg  
 35 40 45

Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala  
 50 55 60

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

Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Cys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95

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

ES 2 778 123 T3

		100						105							110		
		Ala	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				115					120					125			
		<210> 59 <211> 123 <212> PRT <213> Artificial															
5		<220> <223> nanocuerpo															
		<400> 59															
		Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly
		1			5						10					15	
		Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr
					20					25					30		
		Tyr	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Gln	Leu	Leu
				35					40					45			
		Ala	Ser	Ile	Ser	Trp	Arg	Gly	Asp	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val
			50					55					60				
		Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ala	Lys	Asn	Thr	Ile	Tyr
		65					70				75					80	
		Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85						90					95	
		Ala	Ala	Ser	Ile	Leu	Pro	Leu	Ser	Asp	Asp	Pro	Gly	Trp	Asn	Thr	Asn
					100					105					110		
		Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
				115							120						
15		<210> 60 <211> 123 <212> PRT <213> Artificial															
		<220> <223> nanocuerpo															
20		<400> 60															
		Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly
25		1			5						10					15	



ES 2 778 123 T3

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu  
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 61  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> nanocuerpo

10

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp Leu Asn  
 20 25 30

Leu Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Thr Cys Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu His Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Lys Ile Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln

ES 2 778 123 T3

	100		105		110														
	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
			115																
	<210>	62																	
5	<211>	116																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Artificial																	
	<220>																		
10	<223>	nanocuerpo																	
	<400>	62																	
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Glu	Gly	Gly			
	1			5						10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ala	Ala	Ser	Glu	Arg	Ile	Trp	Asp	Ile	Asn			
				20					25					30					
	Leu	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Gly	Pro	Gly	Asn	Glu	Arg	Glu	Leu	Val			
			35					40					45						
	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Gly	Asp	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys			
		50					55					60							
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu			
	65					70					75					80			
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Lys			
					85					90					95				
	Ile	Arg	Arg	Thr	Trp	His	Ser	Glu	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val			
				100					105						110				
	Thr	Val	Ser	Ser															
				115															
15	<210>	63																	
	<211>	115																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Artificial																	
	<220>																		
20	<223>	nanocuerpo																	
	<400>	63																	
	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn			
25	1			5						10					15				

ES 2 778 123 T3

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 64  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> nanocuerpo

10

<400> 64

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Thr Ile Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val

ES 2 778 123 T3

	100		105		110
	Thr Val Ser Ser				
	115				
	<210> 65				
	<211> 114				
5	<212> PRT				
	<213> Artificial				
	<220>				
	<223> nanocuerpo				
10	<400> 65				
	Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly				
	1 5 10 15				
	Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe				
	20 25 30				
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val				
	35 40 45				
	Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val				
	50 55 60				
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr				
	65 70 75 80				
	Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85 90 95				
	Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val				
	100 105 110				
	Ser Ser				
15	<210> 66				
	<211> 114				
	<212> PRT				
	<213> Artificial				
	<220>				
20	<223> nanocuerpo				
	<400> 66				
	Gln Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly				
25	1 5 10 15				

ES 2 778 123 T3

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

<210> 67  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> nanocuerpo

10

<400> 67

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Ile  
 35 40 45

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

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

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

Cys Ala Lys Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr

ES 2 778 123 T3

	100		105		110										
	Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser														
	115		120												
	<210> 68														
	<211> 9														
5	<212> PRT														
	<213> Artificial														
	<220>														
	<223> ligador														
10	<400> 68														
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser														
	1		5												
15	<210> 69														
	<211> 30														
	<212> PRT														
	<213> Artificial														
20	<220>														
	<223> ligador														
	<400> 69														
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly														
	1		5		10									15	
25	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser														
			20					25						30	
	<210> 70														
	<211> 239														
	<212> PRT														
30	<213> Artificial														
	<220>														
	<223> constructo de nanocuerpo														
35	<400> 70														
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly														
	1			5					10					15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr														
			20					25						30	
	Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val														
			35				40					45			
	Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val														
			50			55					60				

ES 2 778 123 T3

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu  
115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp  
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn  
165 170 175

Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
195 200 205

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro  
210 215 220

Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
225 230 235

<210> 71  
<211> 267  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> constructo de nanocuerpo

10 <400> 71

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

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

ES 2 778 123 T3

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu  
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr  
 165 170 175

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 180 185 190

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 195 200 205

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu  
 210 215 220

Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 225 230 235 240

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr  
 245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 260 265

<210> 72  
 <211> 255  
 <212> PRT



ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

5

<400> 72

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu  
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
 130 135 140

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser  
 145 150 155 160

Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu  
 165 170 175

Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr  
 180 185 190

Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys  
 195 200 205

Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
 210 215 220

ES 2 778 123 T3

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly  
 225 230 235 240

Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 245 250 255

<210> 73  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

10

<400> 73

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140

Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp  
 165 170 175

ES 2 778 123 T3

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser  
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu  
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255

Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 74  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

10

<400> 74

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser

ES 2 778 123 T3

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser  
 165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Glu Pro Ser  
 180 185 190

Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu  
 195 200 205

Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr  
 210 215 220

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys  
 225 230 235 240

Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
 245 250 255

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val  
 260 265 270

Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275 280 285

<210> 75  
 <211> 276  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo  
 10 <400> 75

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu  
 35 40 45

ES 2 778 123 T3

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
145 150 155 160

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser  
165 170 175

Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln  
180 185 190

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly  
195 200 205

Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
210 215 220

Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys  
225 230 235 240

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu  
245 250 255

Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
260 265 270

Thr Val Ser Ser  
275

<210> 76  
<211> 115  
<212> PRT

ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

5

<400> 76

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

10

<210> 77

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

<400> 77

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

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

20

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

ES 2 778 123 T3

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 78  
<211> 129  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 78

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
115 120 125

Ser

ES 2 778 123 T3

<210> 79  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<400> 79

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

10 <210> 80  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 80

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



ES 2 778 123 T3

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
115 120 125

Ser

<210> 81  
<211> 129  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 81

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr

ES 2 778 123 T3

85

90

95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 82  
 <211> 129  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

10

<400> 82

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

15 <210> 83  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>

ES 2 778 123 T3

<223> constructo de nanocuerpo

<400> 83

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu  
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
100 105 110

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

<210> 84

<211> 123

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

15 <400> 84

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

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu  
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val

ES 2 778 123 T3

50

55

60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 85

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

10

<400> 85

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu  
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 86

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 778 123 T3

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

5 <400> 86

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu  
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
100 105 110

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

<210> 87

10 <211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 87

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

ES 2 778 123 T3

50

55

60

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 88

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

10

<400> 88

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

15 <210> 89

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 778 123 T3

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

5 <400> 89

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

10 <210> 90  
<211> 363  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> constructo de nanocuerpo

<400> 90

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val

ES 2 778 123 T3

50	55	60																		
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala 75	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr 80					
Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr 95	Cys					
Ala	Arg	Ser	Pro 100	Ser	Gly	Phe	Asn	Arg 105	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln 110	Val	Thr					
Val	Ser	Ser 115	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser 120	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu 125	Val	Gln	Leu					
Val 130	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu 135	Val	Gln	Pro	Gly	Asn 140	Ser	Leu	Arg	Leu					
Ser 145	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly 150	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser 155	Phe	Gly	Met	Ser	Trp 160					
Val	Arg	Gln	Ala	Pro 165	Gly	Lys	Glu	Pro	Glu 170	Trp	Val	Ser	Ser	Ile 175	Ser					
Gly	Ser	Gly	Ser 180	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala 185	Asp	Ser	Val	Lys	Gly 190	Arg	Phe					
Thr	Ile	Ser 195	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys 200	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu 205	Gln	Met	Asn					
Ser 210	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp 215	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys 220	Thr	Ile	Gly	Gly					
Ser 225	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser 230	Gln	Gly	Thr	Gln	Val 235	Thr	Val	Ser	Ser	Gly 240					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 245	Gly	Gly	Ser	Glu	Val 250	Gln	Leu	Val	Glu	Ser 255	Gly					
Gly	Gly	Leu	Val 260	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser 265	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys 270	Ala	Ala					
Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr 280	Trp	Met	Tyr	Trp	Val 285	Arg	Gln	Ala					
Pro 290	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp 295	Val	Ser	Glu	Ile	Asn 300	Thr	Asn	Gly	Leu					



ES 2 778 123 T3

Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
305 310 315 320

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro  
325 330 335

Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn  
340 345 350

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
355 360

<210> 91  
<211> 391  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 91

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
35 40 45

Glu Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu  
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys



ES 2 778 123 T3

<211> 379  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 92

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu  
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
 130 135 140

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 145 150 155 160

Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu  
 165 170 175

Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr  
 180 185 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys  
 195 200 205

10 Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala

ES 2 778 123 T3

210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly  
 225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 245 250 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 260 265 270

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
 275 280 285

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu  
 290 295 300

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
 305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr  
 325 330 335

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 340 345 350

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
 355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 370 375

<210> 93  
 <211> 384  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo  
 10 <400> 93

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

ES 2 778 123 T3

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp  
165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser  
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu  
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val  
245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln  
260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg  
275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser

ES 2 778 123 T3

290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile  
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg  
325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met  
340 345 350

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly  
355 360 365

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
370 375 380

<210> 94  
<211> 400  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 94

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu  
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
115 120 125

ES 2 778 123 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser  
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser  
 165 170 175

Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln  
 180 185 190

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly  
 195 200 205

Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 210 215 220

Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys  
 225 230 235 240

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu  
 245 250 255

Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 260 265 270

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln  
 275 280 285

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg  
 290 295 300

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser  
 305 310 315 320

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile  
 325 330 335

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg  
 340 345 350

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met  
 355 360 365

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly

ES 2 778 123 T3

	370		375		380												
	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
	385					390					395					400	
	<210> 95																
	<211> 115																
5	<212> PRT																
	<213> Artificial																
	<220>																
	<223> constructo de nanocuerpo																
10	<400> 95																
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	
				20					25					30			
	Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40						45				
	Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
	50						55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser	Gly	Phe	Asn	Arg	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				100					105					110			
	Val	Ser	Ser														
			115														
15	<210> 96																
	<211> 115																
	<212> PRT																
	<213> Artificial																
	<220>																
20	<223> constructo de nanocuerpo																
	<400> 96																
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
25	1				5						10				15		



ES 2 778 123 T3

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 97  
 <211> 129  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

10 <400> 97

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
 85 90 95

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

ES 2 778 123 T3

100

105

110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 98  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

10

<400> 98

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

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

Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 35 40 45

Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser  
 100 105 110

Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 99  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

20

<400> 99

ES 2 778 123 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu  
35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
100 105 110

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

<210> 100  
<211> 115  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> constructo de nanocuerpo

10 <400> 100

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr



ES 2 778 123 T3

<400> 102

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

5 <210> 103  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 103

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr



ES 2 778 123 T3

<400> 105

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gln Ile Ile Phe Gly Ser His  
20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Pro Ser Gly Asp Phe Gly Pro Glu Gly Glu Phe Glu  
50 55 60

His Val Thr Ala Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ala Lys Asn Ser  
65 70 75 80

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Pro Tyr Arg Gly Gly Arg Asp  
100 105 110

Tyr Arg Trp Glu Tyr Glu Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
115 120 125

Thr Val  
130

5 <210> 106  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> nanocuerpo

<400> 106

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn Ala Tyr  
20 25 30

Ala Thr Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

15 Ala Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val

ES 2 778 123 T3

50

55

60

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

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Gln Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
115 120

<210> 107  
<211> 119  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> nanocuerpo

10

<400> 107

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gln Leu Phe Ser Thr Asn  
20 25 30

Asp Val Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Asp Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Asp Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Val Ile Ser Arg Glu Gly Glu Met Val Tyr Leu Glu Met  
65 70 75 80

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ile Asn  
85 90 95

Arg Leu Arg Ser Thr Trp Gly Ile Arg Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

15 <210> 108  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Artificial



ES 2 778 123 T3

<220>  
<223> nanocuerpo

5 <400> 108

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

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

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

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ala Ser  
115

10 <210> 109  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> nanocuerpo

<400> 109

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

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

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

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

ES 2 778 123 T3

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ala Arg Gly Asn Arg Glu Ser Thr Val Phe  
65 70 75 80

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

Thr Ala Glu Pro Ile Gly Ala Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 110

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> nanocuerpo

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> restos de aminoácidos desconocidos, probablemente EVQL, QVQL o una secuencia similar

15

<400> 110

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Ser Asp Ser  
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Ala Asp Phe Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Thr Pro Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Ser Tyr Ser Asn Gly Asn Pro His Arg Phe Ser Gln Tyr Gln  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

20

<210> 111

ES 2 778 123 T3

<211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> nanocuerpo

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (77)..(77)  
 <223> Restos de aminoácidos desconocidos

<400> 111

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Trp Gly Gly Gly Ser Ile Val Tyr Ala Glu Ser Ala  
 50 55 60

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

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

Ala Ala Ala Asn Asn Ile Ala Thr Leu Arg Gln Gly Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110

15 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 112  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial

<220>  
 <223> nanocuerpo

25 <400> 112

ES 2 778 123 T3

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Asn Phe Val Thr Tyr  
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Trp Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ser Asn Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Val Val Gln Val Ile Asp Pro Ser Trp Ser Gly Val Asn Leu Asp  
100 105 110

Asp Tyr Asp Tyr Leu Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 113  
<211> 124  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> nanocuerpo

10 <400> 113

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn Ala Tyr  
20 25 30

Ala Thr Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val  
50 55 60

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

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

ES 2 778 123 T3

85

90

95

Gln Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 114  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> nanocuerpo

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Thr Ile Ser Ser Ile Val  
 20 25 30

Met Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Val Pro Pro Arg Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

15 <210> 115  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> nanocuerpo

<400> 115

ES 2 778 123 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Val Pro Arg Tyr Glu Asn Gln Trp Ser Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 116  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> nanocuerpo

10

<400> 116

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

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

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

Ser Gly Ile Asp Ser Gly Gly Gly Ser Pro Met Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 778 123 T3

				85					90					95			
	Ala	Lys	Phe	Ser	Thr	Gly	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Trp	Tyr	Trp	Ser	Tyr	
				100					105					110			
	Gly	Met	Asp	Ser	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			115					120					125				
	<210>	117															
	<211>	121															
5	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	nanocuerpo															
10	<400>	117															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Asp	
	1			5						10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Glu	Arg	Ser	Ser	Asn	Arg	Tyr	
				20					25					30			
	Asn	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Leu	
			35					40						45			
	Ala	Arg	Val	Asp	Val	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Ile	Asn	Gly	Lys	Asn	Ala	Met	Tyr	
	65					70					75				80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Ala	Gly	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	
			100						105					110			
	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115					120									
15	<210>	118															
	<211>	117															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	nanocuerpo															
20	<400>	118															

ES 2 778 123 T3

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

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

Ala Tyr Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu  
35 40 45

Trp Val Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp  
50 55 60

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

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

Tyr Cys Gln Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Arg Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 119  
<211> 129  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> nanocuerpo

10 <400> 119

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Arg Gly Phe Tyr Lys Asn  
20 25 30

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

Ala Ser Ile Lys Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Glu Asn  
65 70 75 80

Thr Val Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp



ES 2 778 123 T3

85

90

95

Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Ser Ser His Tyr Ser Tyr Val Tyr Ser Lys  
 100 105 110

Ala Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 120  
 <211> 115  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> nanocuerpo

10 <400> 120

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

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

Ser Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Tyr Glu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Gln Gly Ile Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

15 <210> 121  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> nanocuerpo

<220>

ES 2 778 123 T3

<221> MISC\_FEATURE

<222> (119)..(119)

<223> Restos de aminoácidos desconocidos

5 <400> 121

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Ile Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Val Val Gln Pro Tyr Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Glu  
100 105 110

Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

10 <210> 122

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> nanocuerpo

<400> 122

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

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

Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu Trp Val  
35 40 45

ES 2 778 123 T3

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Arg Gly Ile Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 123  
<211> 121  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> nanocuerpo

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Ala Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Ser Ser Asn Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 124  
<211> 117  
<212> PRT

ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>

<223> nanocuerpo

5

<400> 124

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr Phe Ser  
20 25 30

Ala Tyr Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu  
35 40 45

Phe Val Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asn  
50 55 60

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

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

Tyr Cys Gln Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Arg Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 125

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> nanocuerpo

<400> 125

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

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

20

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

ES 2 778 123 T3

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

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

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

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

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5 <210> 126  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> nanocuerpo

<400> 126

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

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

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

Ser Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Gly Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Asp Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

15 <210> 127  
<211> 118  
<212> PRT

ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>

<223> nanocuerpo

5

<400> 127

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ala Ser Gly Val Lys Val Asn  
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Asp Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Lys  
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Tyr Trp Ala His Leu Pro Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 128

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> nanocuerpo

<400> 128

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

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

20

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

ES 2 778 123 T3

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

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

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

Ala Ala Glu Pro Leu Ala Arg Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5 <210> 129  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> nanocuerpo

<400> 129

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Thr Arg Thr Asn Asp Arg Phe  
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Glu Asn Thr Val Val  
65 70 75 80

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

Ala Ala Gly Gly Trp Gly Ile Ser Gln Ser Asp Tyr Asp Leu Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 130  
<211> 30  
<212> PRT

ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> elemento FR1

5 <400> 130

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

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

10 <210> 131  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> elemento FR1

<400> 131

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

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

20 <210> 132  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> elemento FR1

30 <400> 132

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

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

35 <210> 133  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> elemento FR1

<400> 133

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

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

45



ES 2 778 123 T3

<210> 134  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 134  
 10  
 Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 <210> 135  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento FR1  
 20  
 <400> 135  
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 25 <210> 136  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 136  
 Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser  
 35 20 25 30  
 <210> 137  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> elemento FR1  
 45 <400> 137

ES 2 778 123 T3

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

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

5 <210> 138  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 138

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

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

15 <210> 139  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 139

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gln Ile Ile Phe Gly  
 20 25 30

25 <210> 140  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 140

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn  
 20 25 30

35 <210> 141  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> elemento FR1

ES 2 778 123 T3

<400> 141

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gln Leu Phe Ser  
20 25 30

5

<210> 142  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> elemento FR1

<400> 142

15

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

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

20

<210> 143  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

25

<220>  
<223> elemento FR1

<400> 143

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

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

30

<210> 144  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> elemento FR1

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(4)

40

<223> Restos de aminoácidos desconocidos, probablemente EVQL, QVQL o una secuencia similar

<400> 144

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

45

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Ser  
20 25 30

ES 2 778 123 T3

5 <210> 145  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR1

10 <400> 145

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

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

15 <210> 146  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento FR1

<400> 146

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Asn Phe Val  
 20 25 30

25 <210> 147  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> elemento FR1

<400> 147

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Asn Ala Gly Ser Thr Ser Asn  
 20 25 30

40 <210> 148  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento FR1

<400> 148

ES 2 778 123 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Thr Ile Ser Ser  
 20 25 30

5 <210> 149  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 149

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

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

15 <210> 150  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 150

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

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

30 <210> 151  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento FR1  
 <400> 151

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Glu Arg Ser Ser Asn  
 20 25 30

40 <210> 152  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>

ES 2 778 123 T3

<223> elemento FR1

<400> 152

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

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr  
20 25 30

<210> 153

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> elemento FR1

15 <400> 153

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

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

<210> 154

20 <211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> elemento FR1

<400> 154

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

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

30 <210> 155

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> elemento FR1

<400> 155

40 <210> 156

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

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

<210> 156

<211> 30

45 <212> PRT

ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>

<223> elemento FR1

5

<400> 156

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

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

10

<210> 157

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> elemento FR1

<400> 157

20

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

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

25

<210> 158

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> elemento FR1

<400> 158

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Cys Val Ser Ser Gly Cys Thr  
20 25 30

35

<210> 159

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> elemento FR1

<400> 159

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

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

45

ES 2 778 123 T3

5 <210> 160  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR1

10 <400> 160

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

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

15 <210> 161  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento FR1

<400> 161

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ala Ser Gly Val Lys  
 20 25 30

25 <210> 162  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> elemento FR1

<400> 162

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

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

40 <210> 163  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR1

45 <400> 163



ES 2 778 123 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Thr Arg Thr Asn  
 20 25

5 <210> 164  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 <400> 164

15 Asp Tyr Trp Met Tyr  
 1 5

20 <210> 165  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 <400> 165

Val Ser Trp Met Tyr  
 1 5

30 <210> 166  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 <400> 166

Val Ser Trp Met Tyr  
 1 5

40 <210> 167  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 <400> 167

50 Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Ile Gly  
 1 5 10

55 <210> 168  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

<223> elemento CDR1  
 <400> 168

**Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly**  
 5    **1**                           **5**                           **10**

<210> 169  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR1

15 <400> 169

**Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Thr Val Gly**  
      **1**                           **5**                           **10**

<210> 170  
 20 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> elemento CDR1

<400> 170

**Ala His Ser Val Tyr Thr Met Gly**  
 30   **1**                           **5**

<210> 171  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <400> 171

<220>  
 <223> elemento CDR1

40 **Gly Tyr Tyr Met Gly**  
      **1**                           **5**

<210> 172  
 <211> 5  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR1

50 <400> 172

**Asn Tyr Tyr Met Gly**  
      **1**                           **5**

55 <210> 173  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>

<223> elemento CDR1  
 <400> 173

5   **Ser His Val Ala Ala**  
       1                   5

<210> 174  
 <211> 5  
 10 <212> PRT  
     <213> Artificial

<400> 174

15   **Ala Tyr Ala Thr Gly**  
       1                   5

<210> 175  
 <211> 5  
 20 <212> PRT  
     <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR1

25 <400> 175

**Thr Asn Asp Val Gly**  
       1                   5

<210> 176  
 <211> 5  
 30 <212> PRT  
     <213> Artificial

<220>  
 35 <223> elemento CDR1

<400> 176

**Thr Thr Ser Met Thr**  
       1                   5

40 <210> 177  
     <211> 5  
     <212> PRT  
     <213> Artificial

45 <400> 177

**Ser Val Ala Met Gly**  
       1                   5

50 <210> 178  
     <211> 5  
     <212> PRT  
     <213> Artificial

55 <220>  
     <223> elemento CDR1

<400> 178

60   **Asp Ser Ala Met Gly**  
       1                   5

<210> 179  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 10 <400> 179  
  
**Thr Tyr Ala Met Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 180  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 180  
  
**Thr Tyr Ala Met Ser**  
**1 5**  
 25  
 <210> 181  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 181  
 35  
**Ala Tyr Ala Thr Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 182  
 <211> 5  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 45  
 <400> 182  
  
**Ile Val Met Leu Gly**  
**1 5**  
 50  
 <210> 183  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 183  
 60  
**Ser Tyr Asp Met Gly**  
**1 5**

<210> 184  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 10 <400> 184  
  
**Thr Tyr Asp Met Ser**  
**1 5**  
  
 <210> 185  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 185  
  
**Arg Tyr Asn Met Ala**  
**1 5**  
 25  
 <210> 186  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 186  
 35  
**Phe Ser Ala Tyr Ser Met Thr**  
**1 5**  
  
 <210> 187  
 <211> 5  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 45  
 <400> 187  
  
**Lys Asn Ala Met Gly**  
**1 5**  
 50  
 <210> 188  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 55  
 <400> 188  
  
**Ala Ser Ser Met Ala**  
**1 5**  
 60

<210> 189  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 10 <400> 189  
  
**Ser Tyr Ala Met Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 190  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 190  
  
**Ala Thr Ser Met Thr**  
**1 5**  
  
 25 <210> 191  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 191  
  
 35 **Asn Tyr Asp Val Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 192  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 192  
  
**Phe Ser Ala Tyr Ser Met Thr**  
**1 5**  
  
 50 <210> 193  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 193  
  
 60 **Thr Ala Asp Met Gly**  
**1 5**

<210> 194  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 10 <400> 194  
  
**Thr Thr Ser Met Thr**  
**1 5**  
  
 <210> 195  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 15  
  
 <220>  
 20 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 195  
  
**Val Asn Asp Met Gly**  
**1 5**  
 25  
  
 <210> 196  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 196  
 35  
  
**Ser Val Ala Met Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 197  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
 45  
  
 <400> 197  
  
**Asp Arg Phe Asn Met Ala**  
**1 5**  
  
 50 <210> 198  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 198  
  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser**  
 60 **1 5 10**

<210> 199  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 10 <400> 199  
  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 1 5 10  
  
 <210> 200  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento FR2  
  
 <400> 200  
  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 25 1 5 10  
  
 <210> 201  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 35 <400> 201  
  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 202  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> elemento FR2  
  
 <400> 202  
  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 50 1 5 10  
  
 <210> 203  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 203  
 60  
  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 1 5 10



<210> 204  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 10 <400> 204  
  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
  
 <210> 205  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento FR2  
  
 <400> 205  
  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gln Leu Leu Ala**  
**1 5 10**  
  
 25 <210> 206  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 206  
  
 35 **Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Leu Gly**  
**1 5 10**  
  
 <210> 207  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 45 <400> 207  
  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
  
 50 <210> 208  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 55 <223> elemento FR2  
  
 <400> 208  
  
**Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
 60 **1 5 10**

<210> 209  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 10 <400> 209  
  
 Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala  
 1 5 10  
 15 <210> 210  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 210  
  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Phe Glu Glu Trp Val Ser  
 25 1 5 10  
  
 <210> 211  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 35 <400> 211  
  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Leu Ala  
 1 5 10  
 40 <210> 212  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 212  
  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 1 5 10  
 50 <210> 213  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 213  
 60 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 1 5 10

<210> 214  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <400> 214  
  
**Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
 10  
 <210> 215  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 215  
 20  
**Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
  
 <210> 216  
 <211> 14  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 30  
 <400> 216  
  
**Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val Ala**  
**1 5 10**  
 35  
 <210> 217  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 217  
  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
 45  
 <210> 218  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 55  
 <400> 218  
  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser**  
**1 5 10**  
 60  
 <210> 219  
 <211> 14

ES 2 778 123 T3

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> elemento FR2  
  
 <400> 219  
  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu Ala**  
**1 5 10**  
 10  
 <210> 220  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 220  
 20  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Glu Glu Trp Val Ser**  
**1 5 10**  
  
 <210> 221  
 <211> 14  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 30  
 <400> 221  
  
**Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
 35  
 <210> 222  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 222  
  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Tyr Glu Glu Trp Val Ser**  
**1 5 10**  
 45  
 <210> 223  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 55  
 <400> 223  
  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
 60  
 <210> 224  
 <211> 14



<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> elemento FR2  
  
 <400> 229  
  
**Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala**  
**1 5 10**  
 10  
 <210> 230  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 230  
 20  
**Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala**  
**1 5 10**  
  
 <210> 231  
 <211> 14  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 30  
 <400> 231  
  
**Trp Phe His Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val Ser**  
**1 5 10**  
 35  
 <210> 232  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> elemento CDR2  
  
 <400> 232  
  
**Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**  
  
 45 **Gly**  
  
 <210> 233  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 55  
 <400> 233

ES 2 778 123 T3

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

5 <210> 234  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 234

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Val Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

15 <210> 235  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 235

25 Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

30 <210> 236  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 236

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

40 <210> 237  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> elemento CDR2

ES 2 778 123 T3

<400> 237

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

5 <210> 238  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 238

Arg Ile Tyr Trp Ser Ser Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

15 <210> 239  
<211> 17  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR2

25 <400> 239

Ser Ile Ser Trp Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Lys Glu Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

30 <210> 240  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 240

Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

40 <210> 241  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> elemento CDR2



ES 2 778 123 T3

<400> 241

Glu Ile Arg Pro Ser Gly Asp Phe Gly Pro Glu Gly Glu Phe Glu His  
 1 5 10 15

Val Thr Ala Ser Leu Lys Gly  
 20

5 <210> 242  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 242

Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 243  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR2  
 25 <400> 243

Thr Ile Thr Asp Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Asp Val Lys Gly  
 1 5 10 15

30 <210> 244  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 244

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

40 Gly

<210> 245  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 45 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR2  
 50 <400> 245

ES 2 778 123 T3

Gly Val Gly Tyr Asp Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ala Glu Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

5 <210> 246  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
10 <220>  
<223> elemento CDR2  
  
<400> 246

Thr Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Ala Asp Phe Val Lys  
1 5 10 15

Gly

15 <210> 247  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
20 <220>  
<223> elemento CDR2  
  
<400> 247

Ala Ile Ser Trp Gly Gly Gly Ser Ile Val Tyr Ala Glu Ser Ala Lys  
1 5 10 15

25 Gly

<210> 248  
<211> 17  
<212> PRT  
30 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> elemento CDR2  
  
35 <400> 248

Ser Ile Ser Trp Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ser Asn Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

40 <210> 249  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
45 <220>  
<223> elemento CDR2  
  
<400> 249

ES 2 778 123 T3

Gly Ile Gln Trp Ser Gly Gly Asp Ala Phe Tyr Arg Asn Ser Val Lys  
 1 5 10 15

**Gly**

5 <210> 250  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 250

Ser Ile Thr Ile Gly Ser Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 1 5 10 15

15 <210> 251  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 251

Arg Ile Ser Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Arg Ala Lys  
 1 5 10 15

25 **Asp**

<210> 252  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 35 <400> 252

Gly Ile Asp Ser Gly Gly Gly Ser Pro Met Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

**Gly**

40 <210> 253  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> elemento CDR2  
 <400> 253

Arg Val Asp Val Ser Gly Gly Asn Thr Leu Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

**Asp**

5 <210> 254  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 254

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Asn  
 1 5 10 15

**Gly**

15 <21C> 255  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 255

Ser Ile Lys Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg  
 1 5 10 15

**Gly**

25 <210> 256  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR2  
 35 <400> 256

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Gln  
 1 5 10 15

**Gly**

40 <210> 257  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 257

ES 2 778 123 T3

Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Ile Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

5 <210> 258  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 258

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

15 <210> 259  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 259

Arg Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Ser Ser Asn Arg Ala Lys  
1 5 10 15

Gly

25 <210> 260  
<211> 17  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR2

35 <400> 260

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asn Ser Val Asn  
1 5 10 15

Gly

40 <210> 261  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> elemento CDR2

<400> 261

Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val Lys  
 1 5 10 15

**Gly**

5 <210> 262  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 262

Phe Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

**Gly**

15 <210> 263  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 263

Thr Ile Thr Asp Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

30 <210> 264  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 35 <400> 264

Ala Ile Gly Tyr Asp Gly Asn Ser Ile Arg Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

**Gly**

40 <210> 265  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 265

ES 2 778 123 T3

Arg Ile Asp Val Ala Gly Tyr Asn Thr Ala Tyr Gly Asp Phe Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 266  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento FR3

<400> 266

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

15 <210> 267  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento FR3

<400> 267

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 25 20 25 30

30 <210> 268  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR3

<400> 268

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Ile Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

40 <210> 269  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

ES 2 778 123 T3

<223> elemento FR3

<400> 269

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu  
1 5 10 15

5 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 270

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> elemento FR3

15 <400> 270

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu  
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 271

20 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> elemento FR3

<400> 271

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu  
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

30 <210> 272

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> elemento FR3

<400> 272

40 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asp Leu Leu  
1 5 10 15

Met Asn Cys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

<210> 273

<211> 32

45 <212> PRT



ES 2 778 123 T3

<213> Artificial

<220>

<223> elemento FR3

5 <400> 273

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

10 <210> 214  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>

<223> elemento FR3

<400> 274

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

20 <210> 275  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>

<223> elemento FR3

30 <400> 275

Arg Phe Thr Ile Ala Lys Asn Ser Val Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

35 <210> 276  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>

<223> elemento FR3

<400> 276

Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met  
 1 5 10 15

Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gln  
 20 25 30

45

ES 2 778 123 T3

<210> 277  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> elemento FR3  
 <400> 277  
 10  
 Arg Phe Val Ile Ser Arg Glu Gly Glu Met Val Tyr Leu Glu Met Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ile  
 20 25 30  
 <210> 278  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento FR3  
 20  
 <400> 273  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg  
 20 25 30  
 25 <210> 279  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> elemento FR3  
 <400> 279  
 Arg Phe Thr Ile Ala Arg Gly Asn Arg Glu Ser Thr Val Phe Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Glu Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Ala  
 35 20 25 30  
 <210> 280  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> elemento FR3  
 45 <400> 280

ES 2 778 123 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Gly Leu Thr Pro Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gly  
 20 25 30

5 <210> 281  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento FR3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> restos de aminoácidos desconocidos

15 <400> 281

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Xaa Thr Met Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 20 25 30

20 <210> 282  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> elemento FR3

<400> 282

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Arg  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val  
 20 25 30

35 <210> 283  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR3

40 <400> 283

Arg Phe Arg Ile Thr Arg Asp Pro Asp Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met  
 1 5 10 15

Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gln  
 20 25 30

45 <210> 284  
 <211> 32

ES 2 778 123 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> elemento FR3

<400> 284

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

10 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala  
20 25 30

<210> 285  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> elemento FR3

<400> 285

20 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asp Arg Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Val  
20 25 30

25 <210> 286  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> elemento FR3

<400> 286

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
20 25 30

35 <210> 287  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> elemento FR3

<400> 237

Arg Phe Thr Val Ser Arg Ile Asn Gly Lys Asn Ala Met Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

45 Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala  
20 25 30

5 <210> 288  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR3

10 <400> 288

Arg Phe Lys Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Arg  
 20 25 30

15 <210> 289  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento FR3

<400> 289

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Glu Asn Thr Val  
 1 5 10 15

Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr  
 20 25 30

Cys Ala Ala  
 35

25 <210> 290  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> elemento FR3

<400> 290

35 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg  
 20 25 30

40 <210> 291  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento FR3

ES 2 778 123 T3

<400> 291

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val His Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys Ala Val  
20 25 30

5

<210> 292  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> elemento FR3

<400> 292

15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asp Asp Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg  
20 25 30

20

<210> 293  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

25

<220>  
<223> elemento FR3

<400> 293

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Arg Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Ala  
20 25 30

30

<210> 294  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> elemento FR3

<400> 294

Arg Phe Lys Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

40

Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Arg  
20 25 30

45

<210> 295  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 778 123 T3

<220>  
<223> elemento FR3

5 <400> 295

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Gln Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Ser  
20 25 30

10 <210> 296  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> elemento FR3

<400> 296

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly Arg  
20 25 30

20 <210> 297  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> elemento FR3

<400> 297

30 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Leu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala  
20 25 30

35 <210> 298  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> elemento FR3

<400> 298

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Asn Thr Met Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

Met Glu Asn Leu Asn Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Leu Cys Ala Ala  
20 25 30

45

ES 2 778 123 T3

<210> 299  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> elemento FR3  
 <400> 299  
 10  
**Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Glu Asn Thr Val Val Leu Gln**  
**1 5 10 15**  
  
**Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Ala**  
**20 25 30**  
 <210> 300  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 20  
 <400> 300  
  
**Ser Pro Ser Gly Phe Asn**  
**1 5**  
 25  
 <210> 301  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 <400> 301  
  
**Ser Pro Ser Gly Ser Phe**  
**1 5**  
 35  
 <210> 302  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 <400> 302  
 45  
  
**Ser Pro Ser Gly Ser Phe**  
**1 5**  
 50  
 <210> 303  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 55  
 <400> 303



ES 2 778 123 T3

**Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Gly Ser Tyr Asn Tyr**  
**1 5 10 15**  
 5 <210> 304  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> elemento CDR3  
 <400> 304  
**Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr**  
**1 5 10 15**  
 15 <210> 305  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 <400> 305  
 25 **Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ser Tyr Asn Tyr**  
**1 5 10 15**  
 30 <210> 306  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 <400> 306  
**Arg Asp Gly Ile Pro Thr Ser Arg Ser Val Glu Ala Tyr Asn Tyr**  
**1 5 10 15**  
 40 <210> 307  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 <400> 307  
**Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Asn**  
**1 5 10**  
 50 <210> 308  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 60 <400> 308

ES 2 778 123 T3

**Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr**  
**1 5 10**

5 <210> 309  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 309

**Ala Pro Tyr Arg Gly Gly Arg Asp Tyr Arg Trp Glu Tyr Glu Tyr Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr**  
 15 <210> 310  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 310

25 **Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Tyr**  
**1 5 10 15**

30 <210> 311  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 311

**Asn Arg Leu Arg Ser Thr Trp Gly Ile Arg Tyr Asp Val**  
**1 5 10**

40 <210> 312  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 312

**Arg Gly Tyr Gly Arg Asp**  
 50 **1 5**

55 <210> 313  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

<223> elemento CDR3  
 <400> 313

**Glu Pro Ile Gly Ala Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr**  
 5    1                    5                            10

<210> 314  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR3

15 <400> 314

**Ser Tyr Ser Asn Gly Asn Pro His Arg Phe Ser Gln Tyr Gln Tyr**  
 1                    5                            10                            15

<210> 315  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> elemento CDR3

<400> 315

**Ala Asn Asn Ile Ala Thr Leu Arg Gln Gly Ser**  
 1                    5                            10

30 <210> 316  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 316

40 **Val Gln Val Ile Asp Pro Ser Trp Ser Gly Val Asn Leu Asp Asp Tyr**  
 1                    5                            10                            15

**Asp Tyr**

<210> 317  
 <211> 16  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR3

50 <400> 317

**Lys Leu Ser Pro Tyr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Tyr**  
 1                    5                            10                            15

55 <210> 318  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR3

5 <400> 318

**Val Pro Pro Arg Asp Asp Tyr**  
1 5

10 <210> 319  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> elemento CDR3

<400> 319

**Pro Arg Tyr Glu Asn Gln Trp Ser Ser Tyr Asp Tyr**  
1 5 10

20 <210> 320  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> elemento CDR3

30 <400> 320

**Phe Ser Thr Gly Ala Asp Gly Gly Ser Trp Tyr Trp Ser Tyr Gly Met**  
1 5 10 15

**Asp Ser**

35 <210> 321  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> elemento CDR3

<400> 321

**Gly Gly Trp Gly Thr Thr Gln Tyr Asp Tyr Asp Tyr**  
1 5 10

45 <210> 322  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> elemento CDR3

<400> 322

55 **Arg Gly Tyr Ala Leu Asp**  
1 5

ES 2 778 123 T3

5 <210> 323  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR3

10 <400> 323  
**Asp Ser Ser His Tyr Ser Tyr Val Tyr Ser Lys Ala Tyr Glu Tyr Asp**  
1 5 10 15

**Tyr**

15 <210> 324  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR3

20 <400> 324  
**Arg Gly Tyr Gly Arg Asp**  
1 5

25 <210> 325  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> elemento CDR3

<400> 325  
**Val Gln Pro Tyr Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Glu Glu Tyr**  
1 5 10 15

35 **Asp Tyr**

<210> 326  
<211> 6  
<212> PRT  
40 <213> Artificial

<220>  
<223> elemento CDR3

45 <400> 326  
**Arg Gly Tyr Gly Arg Asp**  
1 5

50 <210> 327  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> elemento CDR3  
 <400> 327

**Ala Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Ser Ser Asn Asp Tyr**  
 5    1                    5                    10

<210> 328  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR3

15 <400> 328

**Arg Gly Tyr Ala Leu Asp**  
 1                    5

<210> 329  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> elemento CDR3

<400> 329

**Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr**  
 1                    5                    10

30 <210> 330  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento CDR3

<400> 330

40 **Arg Gly Tyr Gly Arg Asp**  
 1                    5

<210> 331  
 <211> 10  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR3

50 <400> 331

**Arg Thr Tyr Trp Ala His Leu Pro Thr Tyr**  
 1                    5                    10

55 <210> 332  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>

<223> elemento CDR3  
 <400> 332

**Glu Pro Leu Ala Arg Tyr Glu Gly Leu Trp Thr Tyr**  
 5    1                    5                    10

<210> 333  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento CDR3

15 <400> 333

**Gly Gly Trp Gly Ile Ser Gln Ser Asp Tyr Asp Leu**  
      1                    5                    10

<210> 334  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> elemento FR4

<400> 334

**Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      1                    5                    10

30 <210> 335  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento FR4

<400> 335

40 **Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      1                    5                    10

<210> 336  
 <211> 11  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR4

50 <400> 336

**Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      1                    5                    10

55 <210> 337  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>





<223> elemento FR4  
 <400> 342

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
 5    **1**                    **5**                    **10**

<210> 343  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR4

15 <400> 343

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

<210> 344  
 20 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> elemento FR4

<400> 344

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
 30   **1**                    **5**                    **10**

<210> 345  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento FR4

<400> 345

40 **Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

<210> 346  
 <211> 11  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR4

50 <400> 346

**Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr Val Ala Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

55 <210> 347  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>

<223> elemento FR4  
 <400> 347

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
 5    **1**                    **5**                    **10**

<210> 348  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR4

15 <400> 348

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

<210> 349  
 20 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> elemento FR4

<400> 349

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

30 <210> 350  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento FR4

<400> 350

40 **Leu Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

<210> 351  
 <211> 11  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR4

50 <400> 351

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

55 <210> 352  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>

<223> elemento FR4  
 <400> 352

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
 5    **1**                    **5**                    **10**

<210> 353  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR4

15 <400> 353

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

<210> 354  
 20 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> elemento FR4

<400> 354

**Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
 30   **1**                    **5**                    **10**

<210> 355  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento FR4

<400> 355

40 **Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

<210> 356  
 <211> 11  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR4

50 <400> 356

**Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
      **1**                    **5**                    **10**

55 <210> 357  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>



<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> elemento FR4  
 <400> 362  
**Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
 10 **1 5 10**  
 <210> 363  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento FR4  
 20 <400> 363  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 <210> 364  
 25 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> elemento FR4  
 <400> 364  
**Arg Ser Lys Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser**  
 35 **1 5 10**  
 <210> 365  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> elemento FR4  
 <400> 365  
 45 **Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 <210> 366  
 <211> 11  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento FR4  
 55 <400> 366  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 60 <210> 367

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> elemento FR4

<400> 367

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 10 1 5 10

<210> 368  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR1

20 <400> 368

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp  
 20 25 30

<210> 369  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> elemento FR1

<400> 369

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Trp Asp  
 20 25 30

35 <210> 370  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> elemento FR1

<400> 370

45 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15

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

<210> 371  
 <211> 30

ES 2 778 123 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> elemento FR1

<400> 371

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

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

10 <210> 372  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> elemento FR1

<400> 372

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

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

25 <210> 373  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> elemento FR1

<400> 373

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

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

35 <210> 374  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> elemento FR1

<400> 374

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

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

45

<210> 375  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 10 <400> 375  
  
**Leu Asn Leu Met Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 376  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 376  
  
**Ile Asn Leu Leu Gly**  
**1 5**  
  
 25 <210> 377  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 377  
  
 35 **Ser Phe Gly Met Ser**  
**1 5**  
  
 <210> 378  
 <211> 5  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 45 <400> 378  
  
**Ser Phe Gly Met Ser**  
**1 5**  
  
 50 <210> 379  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 379  
  
**Ser Phe Gly Met Ser**  
 60 **1 5**



<210> 380  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento CDR1  
  
 10 <400> 380  
  
**Ser Phe Gly Met Ser**  
**1 5**  
  
 <210> 381  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento CDR1  
  
 <400> 381  
  
**Asn Tyr Trp Met Tyr**  
**1 5**  
  
 25 <210> 382  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 382  
  
 35 **Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala**  
**1 5 10**  
  
 <210> 383  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 45 <400> 383  
  
**Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala**  
**1 5 10**  
  
 50 <210> 384  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 384  
  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser**  
 60 **1 5 10**

<210> 385  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 10 <400> 385  
  
**Trp Val Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val Ser**  
**1 5 10**  
  
 <210> 386  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> elemento FR2  
  
 <400> 386  
  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Gln Glu Trp Val Ser**  
**1 5 10**  
 25  
 <210> 387  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
  
 <400> 387  
 35  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ser**  
**1 5 10**  
  
 <210> 338  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento FR2  
 45  
 <400> 388  
  
**Trp Val Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Ile Ser**  
**1 5 10**  
 50  
 <210> 389  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> elemento CDR2  
  
 <400> 389

ES 2 778 123 T3

Thr Cys Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

5 <210> 390  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
10 <220>  
<223> elemento CDR2  
  
<400> 390

Thr Ile Thr Val Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
1 5 10 15

15 <210> 391  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
20 <220>  
<223> elemento CDR2  
  
<400> 391

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

25 Gly

<210> 392  
<211> 17  
<212> PRT  
30 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> elemento CDR2  
  
35 <400> 392

Ser Ile Asn Gly Arg Gly Asp Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

40 <210> 393  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
45 <223> elemento CDR2  
  
<400> 393

ES 2 778 123 T3

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 394  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 10 <400> 394

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 395  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento CDR2  
 <400> 395

Arg Asp Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 1 5 10 15

25 Lys Gly  
 <210> 396  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento FR3  
 35 <400> 396

Arg Phe Thr Ile Ser Met Asp Tyr Thr Lys Gln Thr Val Tyr Leu His  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile  
 20 25 30

40 <210> 397  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 45 <223> elemento FR3  
 <400> 397

ES 2 778 123 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Lys Ile  
 20 25 30

5 <210> 398  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> elemento FR3  
 <400> 398

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile  
 20 25 30

15 <210> 399  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> elemento FR3  
 <400> 399

Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Tyr Cys Thr Ile  
 20 25 30

30 <210> 400  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> elemento FR3  
 <400> 400

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ile  
 20 25 30

40 <210> 401  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45

ES 2 778 123 T3

<220>  
<223> elemento FR3

<400> 401

5 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ile  
20 25 30

<210> 402  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> elemento FR3

15

<400> 402

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys  
20 25 30

20 <210> 403  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> elemento CDR3

<400> 403

30 Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu  
1 5

<210> 404  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> elemento CDR3

40 <400> 404

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu  
1 5

<210> 405  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

45

<220>  
<223> elemento CDR3

50

<400> 405

**Gly Gly Ser Leu Ser Arg**  
 1 5  
 <210> 406  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 10 <400> 406  
**Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser**  
 1 5  
 15 <210> 407  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 <400> 407  
**Gly Arg Gly Ser Pro**  
 25 1 5  
 <210> 408  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento CDR3  
 35 <400> 408  
**Gly Arg Gly Ser Pro**  
 1 5  
 40 <210> 409  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> elemento CDR3  
 <400> 409  
**Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr**  
 1 5 10  
 50 <210> 410  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> elemento FR4  
 <400> 410  
 60

**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 5 <210> 411  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento FR4  
 10 <400> 411  
**Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 15 <210> 412  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> elemento FR4  
 <400> 412  
**Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 25 <210> 413  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento FR4  
 35 <400> 413  
**Arg Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 40 <210> 414  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> elemento FR4  
 <400> 414  
**Ser Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**  
 50 <210> 415  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> elemento FR4  
 <400> 415  
 60



Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 416

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> elemento FR4

10

<400> 416

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 417

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> constructo de nanocuerpo

20

<400> 417

ES 2 778 123 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 115 120 125  
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu  
 130 135 140  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser  
 165 170 175  
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 180 185 190  
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
 195 200 205

ES 2 778 123 T3

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly  
 210 215 220

Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 245 250 255

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 260 265 270

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala  
 275 280 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu  
 290 295 300

Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 305 310 315 320

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro  
 325 330 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn  
 340 345 350

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 355 360

<210> 418  
 <211> 379  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

10 <400> 418

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Leu  
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val

ES 2 778 123 T3

50						55										60
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser 75	Lys	Asn	Thr	Ile	Tyr 80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys	
Ala	Ala	Ser	Ile 100	Leu	Pro	Leu	Ser	Asp 105	Asp	Pro	Gly	Trp	Asn 110	Thr	Tyr	
Trp	Gly	Gln 115	Gly	Thr	Leu	Val	Thr 120	Val	Ser	Ser	Gly	Gly 125	Gly	Gly	Ser	
Gly 130	Gly	Gly	Ser	Glu	Val 135	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly 140	Gly	Gly	Leu	Val	
Gln 145	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu 150	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala 155	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr 160	
Phe	Ser	Ser	Phe	Gly 165	Met	Ser	Trp	Val	Arg 170	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys 175	Gly	
Leu	Glu	Trp	Val 180	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly 185	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr 190	Leu	Tyr	
Ala	Asp	Ser 195	Val	Lys	Gly	Arg	Phe 200	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp 205	Asn	Ala	Lys	
Thr 210	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln 215	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro 220	Glu	Asp	Thr	Ala	
Val 225	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile 230	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser 235	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly 240	
Thr	Leu	Val	Thr	Val 245	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly 250	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly 255	Ser	
Glu	Val	Gln 260	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly 265	Gly	Leu	Val	Gln	Pro 270	Gly	Gly	
Ser	Leu	Arg 275	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala 280	Ser	Gly	Arg	Ser	Leu	Ser 285	Asn	Tyr	
Tyr 290	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln 295	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly 300	Arg	Glu	Leu	Leu	

ES 2 778 123 T3

Gly Asn Ile Ser Trp Arg Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val  
 305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ile Tyr  
 325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 340 345 350

Ala Ala Ser Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr  
 355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 370 375

<210> 419  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> constructo de nanocuerpo

10

<400> 419

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

ES 2 778 123 T3

130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp  
165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser  
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu  
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val  
245 250 255

Thr Val Ser Cys  
260

<210> 420  
<211> 264  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> constructo de nanocuerpo

<400> 420

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

ES 2 778 123 T3

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp  
 165 170 175

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 180 185 190

Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser  
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu  
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Cys  
 260

<210> 421  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> cebador oligonucleotídico

10

<400> 421

ggataacaat ttcacacagg

20

15 <210> 422  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

	<220>		
	<223>	cebador oligonucleotídico	
5	<400>	422	
		tcagtaacct ggatccgccca ccgctgcctc caccgcctga ggagacggtg accag	55
	<210>	423	
10	<211>	39	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
15	<223>	cebador oligonucleotídico	
	<400>	423	
		aggttactga ggatccgagg tgcagctggt ggagtctgg	39
20	<210>	424	
	<211>	46	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
25	<220>		
	<223>	cebador oligonucleotídico	
	<400>	424	
30		tcagtaacct tccggaaccg ccaccgcctg aggagacggg gacaag	46
	<210>	425	
35	<211>	48	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
40	<223>	cebador oligonucleotídico	
	<400>	425	
		aggtcactga tccggaggcg gtagcgaggt gcagctggtg gagtctgg	48
45	<210>	426	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	cebador oligonucleotídico	
	<400>	426	
55		cacgacgttg taaaacgac	19
	<210>	427	
	<211>	43	
	<212>	ADN	
60	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	cebador oligonucleotídico	
65	<400>	427	



ES 2 778 123 T3

	atggtggtgt gcggccgcct attatgagga gacggtgacc agg	43
	<210> 428	
	<211> 45	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 428	
	aggggtatct ctcgagaaaa gagaggtgca gctggtggag tctgg	45
15	<210> 429	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 429	
25	gctaaagaag aaggggtatc tctcgagaaa agagaggtgc agctggtgga gtctgg	56
	<210> 430	
	<211> 88	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
35	<400> 430	
	<b>tcagtaacct ggatcccccg ccaccgctgc ctccaccgcc gctacccccg ccaccgctgc</b>	<b>60</b>
	<b>ctccaccgcc tgaggagacg gtgacaag</b>	<b>88</b>
40	<210> 431	
	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 431	
	<b>aggttactga ggatccggcg gtggaggcag cggtagcgagg tgcagctggt</b>	<b>60</b>
	<b>ggagtctgg</b>	<b>69</b>
50	<210> 432	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 432	
60	atggtggtgt gaattcttat tagcaggaga cggtgacaag g	41

<210> 433  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador oligonucleotídico  
 10 <400> 433  
  
 atgggtgtg gaattcttat tagcaacctc cacctgagga gacggtgaca agg 53  
  
 <210> 434  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> cebador oligonucleotídico  
  
 <400> 434  
  
 gactggttc aattgacaag c 21  
 25  
 <210> 435  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> cebador oligonucleotídico  
  
 <400> 435  
 35 gcaaatggca ttctgacatc c 21  
  
 <210> 436  
 <211> 13  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Elemento CDR3  
 45  
 <400> 436  
  
**Ile Leu Pro Leu Ser Asp Asp Pro Gly Trp Asn Thr Tyr**  
**1 5 10**  
 50 <210> 437  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 437  
  
**Lys Glu Arg Glu**  
 60 **1**  
  
 <210> 438  
 <211> 4

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 438  
  
**Lys Gln Arg Glu**  
**1**  
 10  
 <210> 439  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 439  
 20  
**Gly Leu Glu Trp**  
**1**  
  
 <210> 440  
 <211> 5  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 30  
 <400> 440  
  
**Lys Glu Arg Glu Leu**  
**1 5**  
 35 <210> 441  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 441  
 45 **Lys Glu Arg Glu Phe**  
**1 5**  
  
 <210> 442  
 <211> 5  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 55  
 <400> 442  
  
**Lys Gln Arg Glu Leu**  
**1 5**  
 60 <210> 443  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 443  
  
**Lys Gln Arg Glu Phe**  
**1 5**  
 10  
 <210> 444  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 444  
 20  
**Lys Glu Arg Glu Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 445  
 <211> 4  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 30  
 <400> 445  
  
**Thr Glu Arg Glu**  
**1**  
 35  
 <210> 446  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 446  
  
**Thr Glu Arg Glu Leu**  
**1 5**  
 45  
 <210> 447  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 55  
 <400> 447  
  
**Lys Glu Cys Glu**  
**1**  
 60  
 <210> 448  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 448  
  
**Lys Glu Cys Glu Leu**  
**1 5**  
 10  
 <210> 449  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 449  
 20  
**Lys Glu Cys Glu Arg**  
**1 5**  
  
 <210> 450  
 <211> 4  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 30  
 <400> 450  
  
**Arg Glu Arg Glu**  
**1**  
  
 35  
 <210> 451  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
  
 <400> 451  
 45  
**Arg Glu Arg Glu Gly**  
**1 5**  
  
 <210> 452  
 <211> 4  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 55  
 <400> 452  
  
**Gln Glu Arg Glu**  
**1**

<210> 453  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 453  
 10  
**Gln Glu Arg Glu Gly**  
 1 5  
 <210> 454  
 <211> 4  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 20 <400> 454  
**Lys Gly Arg Glu**  
 1  
 25 <210> 455  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 455  
**Lys Gly Arg Glu Gly**  
 35 1 5  
 <210> 456  
 <211> 4  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 45 <400> 456  
**Lys Asp Arg Glu**  
 1  
 <210> 457  
 <211> 5  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 55 <400> 457  
**Lys Asp Arg Glu Val**  
 60 1 5

<210> 458  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 458  
 10  
**Asp Glu Cys Lys Leu**  
 1 5  
 <210> 459  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 20  
 <400> 459  
**Asn Val Cys Glu Leu**  
 1 5  
 25  
 <210> 460  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 460  
 35  
**Gly Val Glu Trp**  
 1  
 <210> 461  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 45  
 <400> 461  
**Glu Pro Glu Trp**  
 1  
 50  
 <210> 462  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 462  
**Gly Leu Glu Arg**  
 60 1

<210> 463  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 463  
 10  
**Asp Gln Glu Trp**  
**1**  
 <210> 464  
 <211> 4  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 20 <400> 464  
**Asp Leu Glu Trp**  
**1**  
 25 <210> 465  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 465  
**Gly Ile Glu Trp**  
 35 **1**  
 <210> 466  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> elemento de nanocuerpo  
 45 <400> 466  
**Glu Leu Glu Trp**  
**1**  
 <210> 467  
 <211> 4  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> elemento de nanocuerpo  
 <400> 467  
**Gly Pro Glu Trp**  
**1**  
 60



<210> 468  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
5  
<220>  
<223> elemento de nanocuerpo  
  
<400> 468  
10  
**Glu Trp Leu Pro**  
1  
  
<210> 469  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
15  
<220>  
<223> elemento de nanocuerpo  
20  
<400> 469  
  
**Gly Pro Glu Arg**  
1  
25  
<210> 470  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
30  
<220>  
<223> elemento de nanocuerpo  
  
<400> 470  
35  
**Gly Leu Glu Arg**  
1  
  
<210> 471  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
40  
<220>  
<223> espaciador  
45  
<400> 471  
  
**Gly Gly Gly Cys**  
1  
  
<210> 472  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Artificial  
50  
<220>  
<223> constructo de inmunoglobulina  
55  
<400> 472

ES 2 778 123 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105

5 <210> 473  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> constructo de inmunoglobulina

<400> 473

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105

15 <210> 474

ES 2 778 123 T3

<211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> constructo de inmunoglobulina

<400> 474

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

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

10 Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105

<210> 475  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> constructo de inmunoglobulina

20 <400> 475

ES 2 778 123 T3

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

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

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

5 <210> 476  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> ligador

<400> 476

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala  
 1 5 10 15

15 Ala

## REIVINDICACIONES

1. Dominio variable de inmunoglobulina que se une a TNF $\alpha$  que comprende cuatro regiones de entramado (FR1 a FR4) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3), en el que:
- 5 a) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TADMG (SEQ ID NO: 193);
- b) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO: 261); y
- 10 c) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO: 329).
2. Dominio variable de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de inmunoglobulina está representado por SEQ ID NO: 125.
- 15 3. Dominio variable de inmunoglobulina según la reivindicación 1 ó 2, que está humanizado.
4. Polipéptido que comprende al menos un dominio variable de inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 5. Polipéptido según la reivindicación 4, que comprende además al menos un dominio variable de inmunoglobulina que se une a albúmina sérica humana.
6. Polipéptido según la reivindicación 5, en el que el al menos un dominio variable de inmunoglobulina que se une a albúmina sérica humana se selecciona de ALB1 = SEQ ID NO: 63, ALB3 = SEQ ID NO: 87, ALB4 = SEQ ID NO: 88, ALB5 = SEQ ID NO: 89, ALB6 = SEQ ID NO: 100, ALB7 = SEQ ID NO: 101, ALB8 = SEQ ID NO: 102, ALB9 = SEQ ID NO: 103 y ALB10 = SEQ ID NO: 104.
- 25 7. Polipéptido según la reivindicación 5 ó 6, en el que el dominio variable de inmunoglobulina que se une a TNF $\alpha$  está unido al dominio variable de inmunoglobulina que se une a albúmina sérica humana por medio de un ligador.
- 30 8. Polipéptido según la reivindicación 7, en el que dicho ligador se elige del grupo que consiste en:
- 35 - una secuencia de aminoácidos que comprende de 3 a 40 aminoácidos;
- una secuencia de aminoácidos que comprende de 20 a 40 aminoácidos;
- una secuencia de aminoácidos que comprende de 5 a 15 aminoácidos;
- 40 - una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 14 aminoácidos;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 17 aminoácidos;
- 45 - una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de glicina y serina; y
- una secuencia de aminoácidos que consiste en GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69).
- 50 9. Polipéptido según la reivindicación 4, en el que dicho polipéptido está pegilado.
10. Ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio variable de inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
- 55 11. Célula huésped que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10.
12. Método para preparar un dominio variable de inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que comprende cultivar o mantener una célula huésped según la reivindicación 11 en condiciones tales que dicha célula huésped produce dicho dominio variable de inmunoglobulina o dicho polipéptido.
- 60 13. Composición farmacéutica, que comprende al menos un dominio variable de inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
- 65

PMP1C2	qvqlvesggg	lvqpggslrl	scaasGFTFS	D....YWMY	wvrqapgkgl	class I
PMP1G11	qvqlqesggg	mvqpggslrl	scaasGFDFG	V....SWMY	wvrqapgkgl	
PMP1H6	evqlvesggg	lvqpggslrl	scatsGFDFS	V....SWMY	wvrqapgkgl	
PMP3D10	qvqlvesggg	lvqaggsisl	scaasGRSFT	G....YYMG	wfrqapgker	class III
PMP5F10	evqlvesggg	lvqaggsisl	scsasGRSLS	N....YYMG	wfrqapgker	
PMP1G5	qvqlvesggg	lvqaggsirl	scaasGRTFS	EPSGYTYTIG	wfrqapgker	class II
PMP1H2	qvkleesggg	lvqpgdslrl	scaasGRTFS	DYSGYTYTVG	wfrqapgker	
PMP3G2	avqlvesggg	lvqpgdslrl	scaasGRTFS	DYSGYTYTVG	wfrqapgker	
PMP1D2	avqlvdsagg	lvqaggsirl	scaasGRTFS	AHSV..YTMG	wfrqapgker	class IIb
PMP1C2	ewvseINTNG	LITKYPDSVK	Grftisrdna	kntlylqmns	lkpedtalyy	
PMP1G11	ewvseINTNG	LITKYPDSVK	Grftisrdna	ktlylqmns	lkpedtalyy	
PMP1H6	ewvseINTNG	LITKYVDSVK	Grftisrdna	kntlylqmds	lipedtalyy	
PMP3D10	qllasISWRG	DNTYYKESVK	Grftisrdda	kntiylqmns	lkpedtavyy	
PMP5F10	ellqnISWRG	YNIYYKDSVK	Grftisrdda	kntiylqmnr	lkpedtavyy	
PMP1G5	efvarIYWSS	GLTYYADSVK	Grftisrdia	kntvdlmns	lkpedtavyy	
PMP1H2	efvarIYWSS	GNTYYADSVK	Grftisrdia	kntvdlmnn	lepedtavyy	
PMP3G2	efvarIYWSS	GNTYYADSVK	Grftisrdia	kntvdlmnn	lepedtavyy	
PMP1D2	efvarIYWSS	ANTYYADSVK	Grftisrdna	kntvdlmnc	lkpedtavyy	
PMP1C2	carS.....	...PSGFNrg	qgtqvtvss			
PMP1G11	carS.....	...PSGSFrg	qgtqvtvss			
PMP1H6	carS.....	...PSGSFrg	qgtqvtvss			
PMP3D10	caaS..ILPLS	DDPGWNTNwg	qgtqvtvss			
PMP5F10	caaS..ILPLS	DDPGWNTYwg	qgtqvtvss			
PMP1G5	caaRDGIPTS	RSVGSYNYwg	qgtqvtvss			
PMP1H2	caaRDGIPTS	RSVESYNYwg	qgtqvtvss			
PMP3G2	caaRDGIPTS	RSVESYNYwg	qgtqvtvss			
PMP1D2	caaRDGIPTS	RSVEAYNYwg	qgtqvtvss			

Figura 1

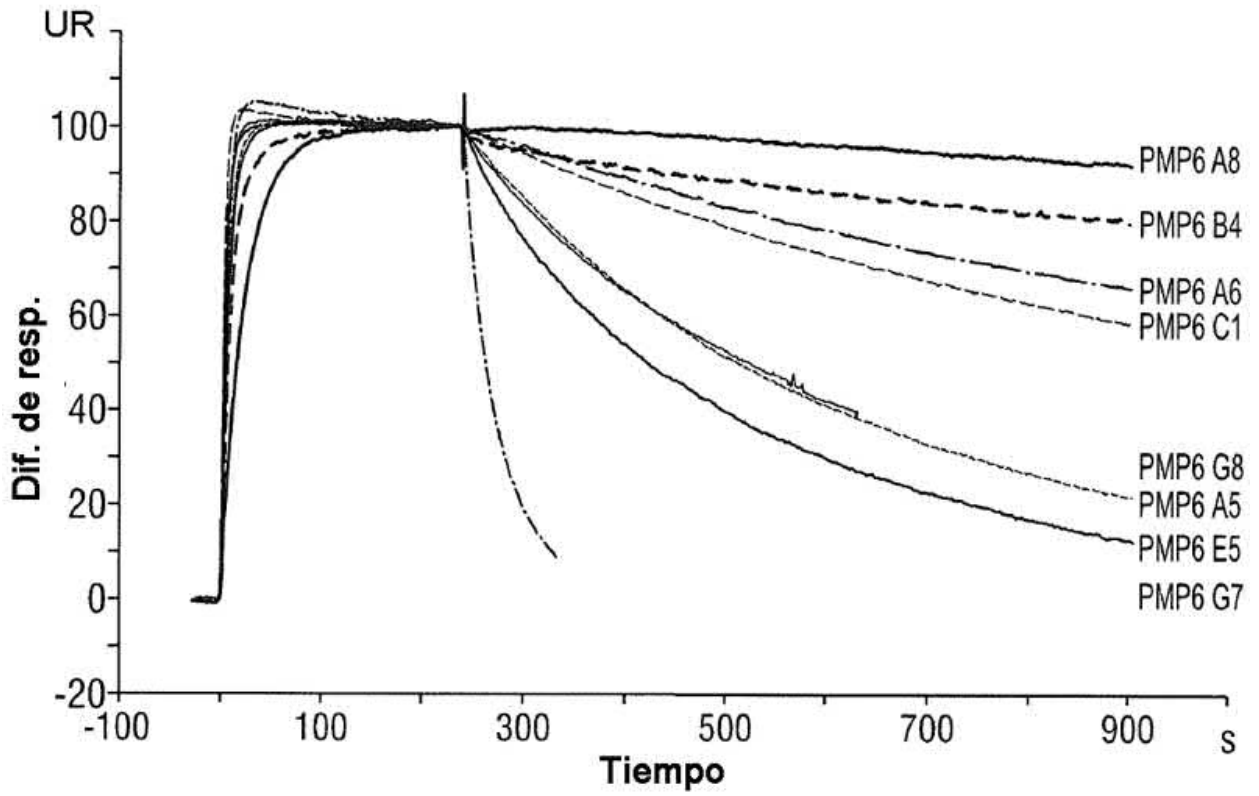
Hum+, Rhe+, Mou+ >	PMP6G8	avqlvesggg	lvqpggslrl	tctasGFTFR	SFGMSwvrqa	pgkdqewvsa	A
Hum+, Rhe+, Mou- >	PMP6A5	qvqlaesggg	lvqpggslrl	tctasGFTFG	SFGMSwvrqa	pqeglewvsa	
Hum+, Rhe+, Mou+ >	PMP6A6	avqlvesggg	lvqpgnslrl	scaasGFTFR	SFGMSwvrqa	pkkepewvss	B
Hum+, Rhe+, Mou+ >	PMP6C1	avqlvdsagg	lvqpggslrl	scaasGFSG	SFGMSwvrqa	pkkepewvss	
Hum+, Rhe+, Mou+ >	PMP6A8	avqlvesggg	lvqgggslrl	acaasERIFD	INLMGwvrqg	pgnerelvat	C
Hum+, Rhe+, Mou+ >	PMP6B4	evqlvesggg	lvqeggsrlrl	acaasERIWD	INLLGwvrqg	pgnerelvat	
Hum+, Rhe-, Mou- >	PMP6G7	qvqlvesggg	lvqpggslrl	scaasGFTFS	NYWMYwvrva	pgkqlerisr	D

PMP6G8	ISADSSTKNY	ADSVKGrfti	srnakkmly	lemnslkped	tavyycviGR
PMP6A5	ISADSSDKRY	ADSVKGrfti	srnakkmly	lemnslksed	tavyycviGR
PMP6A6	ISGSGSDTLY	ADSVKGrfti	srnakkttly	lqmnslkped	tavyycctiGG
PMP6C1	INGRGDDTRY	ADSVKGrfsi	srnakkntly	lqmnslkped	taeyycctiGR
PMP6A8	ITVG.DSTNY	ADSVKGrfti	smdytkqtv	lhmslrped	tglyyckiRR
PMP6B4	ITVG.DSTSY	ADSVKGrfti	srdydkntly	lqmnslrped	tglyyckiRR
PMP6G7	ISTGGGYSY	ADSVKGrfti	srnakkntly	lqmnslkped	talyycakDR

PMP6G8	GSPs.....	..spgtqvtv	ss
PMP6A5	GSPa.....	..sqgtqvtv	ss
PMP6A6	SLSRs.....	..sqgtqvtv	ss
PMP6C1	SVSRs.....	..rtqgtqvtv	ss
PMP6A8	TWHSEL....	..wgqgtqvtv	ss
PMP6B4	TWHSEL....	..wgqgtqvtv	ss
PMP6G7	EAQVDTLDFD	Yrgqgtqvtv	ss

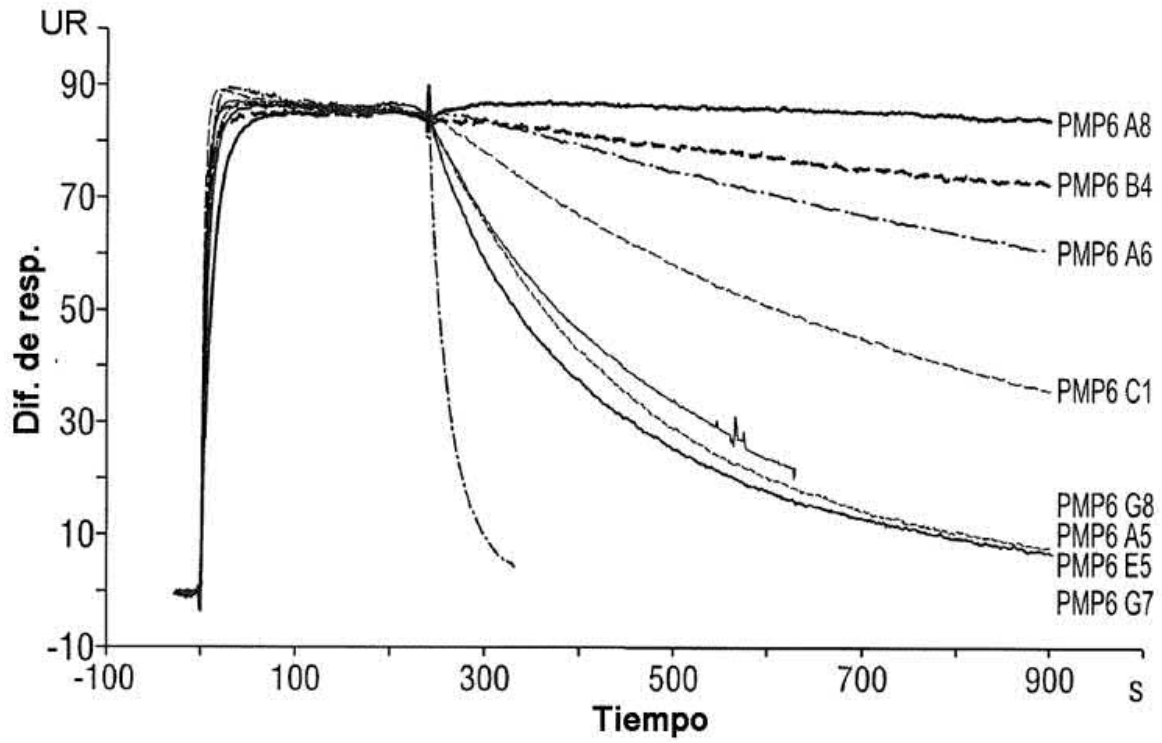
Figura 2

**Detección de nanocuerpos específicos de albúmina frente a SA humano**



**Figura 3**

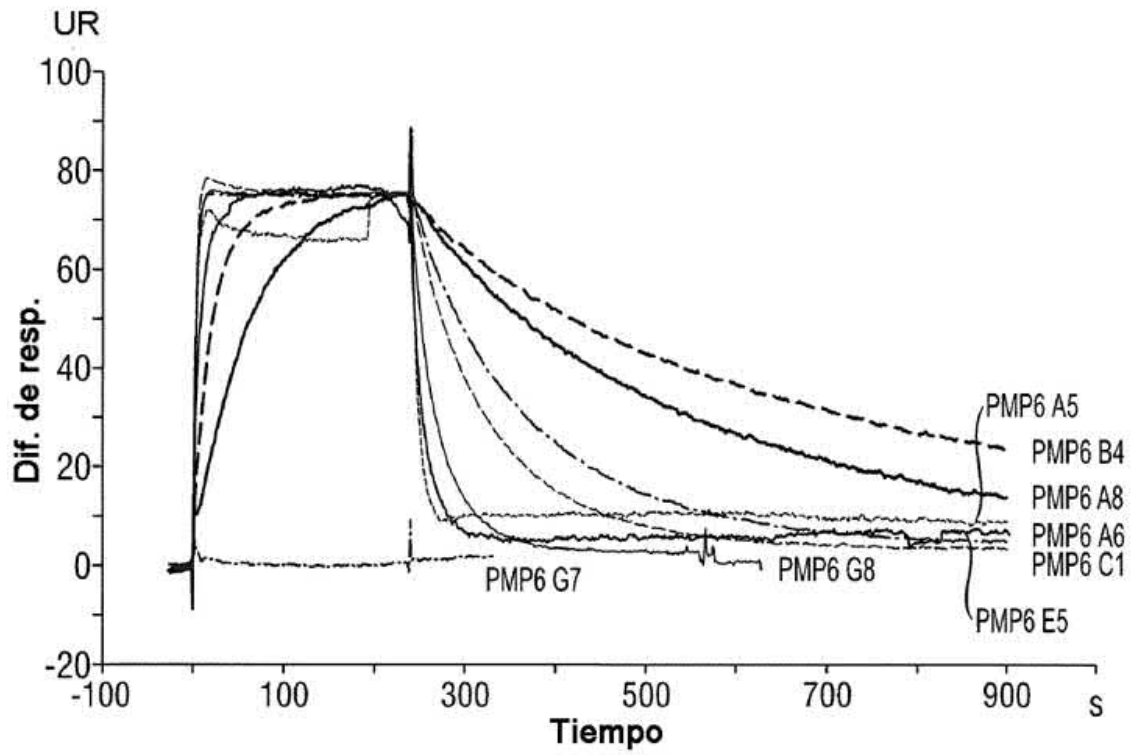
**Detección de nanocuerpos específicos de albúmina frente a SA de rhesus**



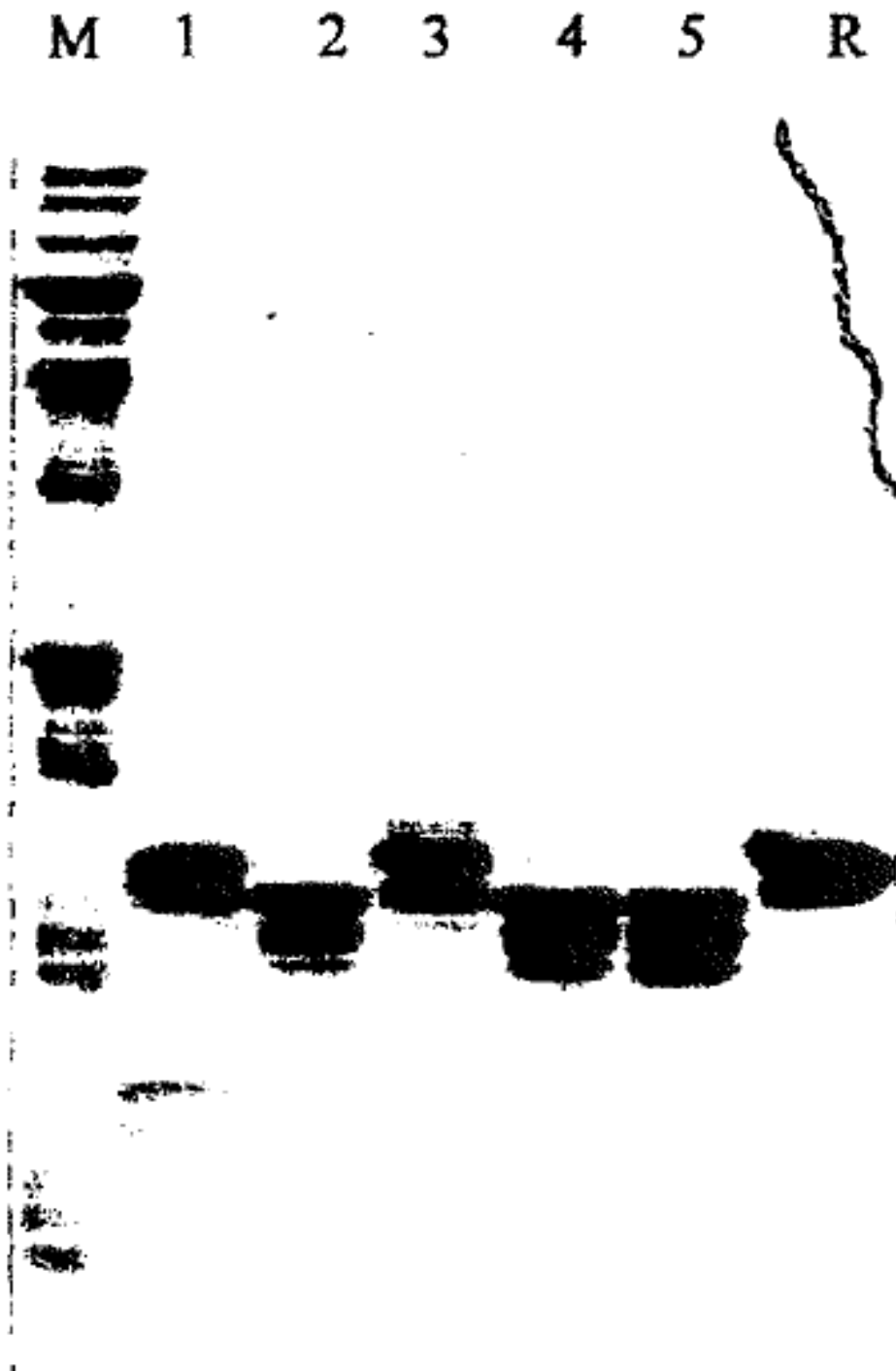
**Figura 4**



Detección de nanocuerpos específicos de albúmina frente a SA de ratón



**Figura 5**



**Figura 6**

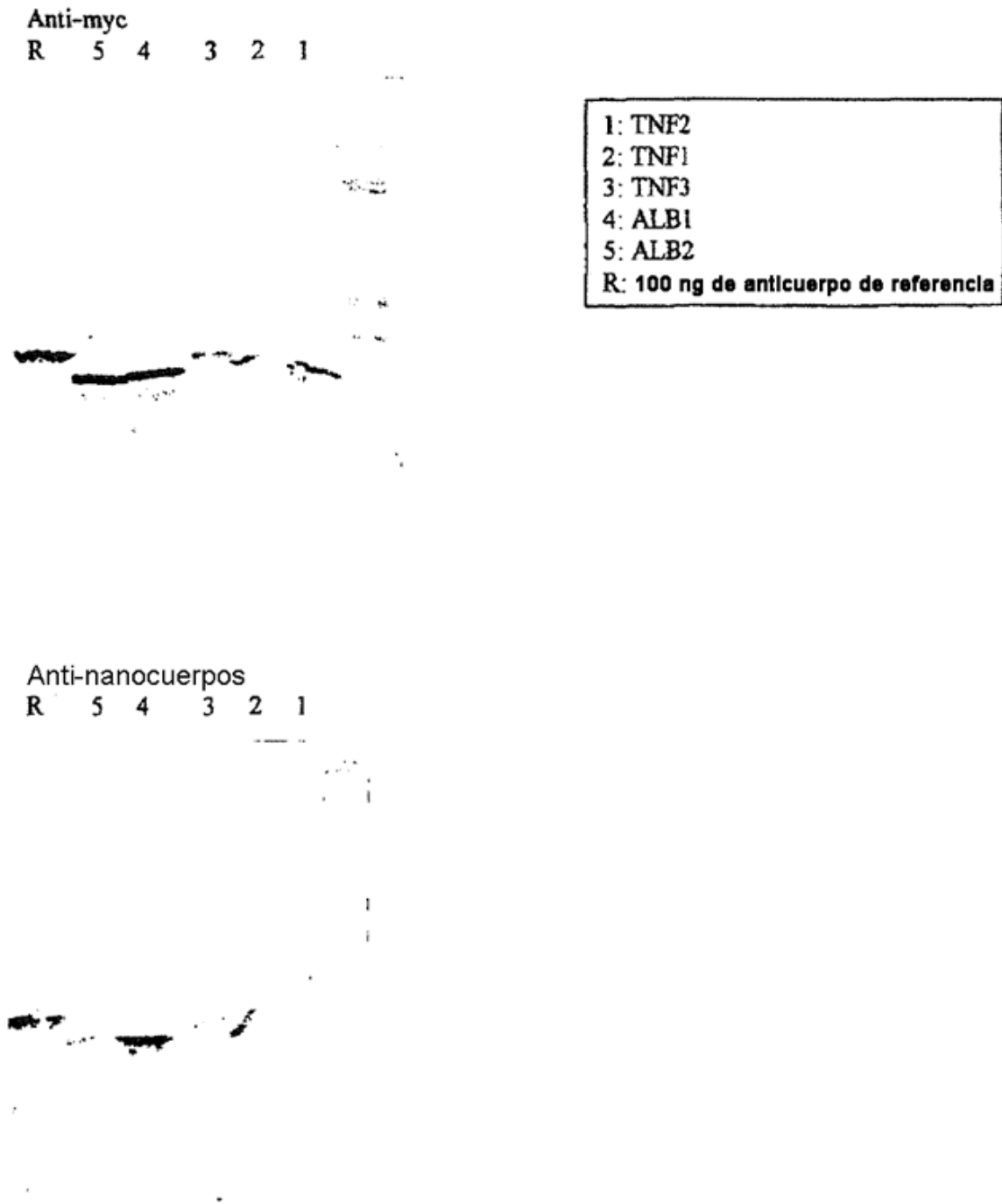


Figura 7

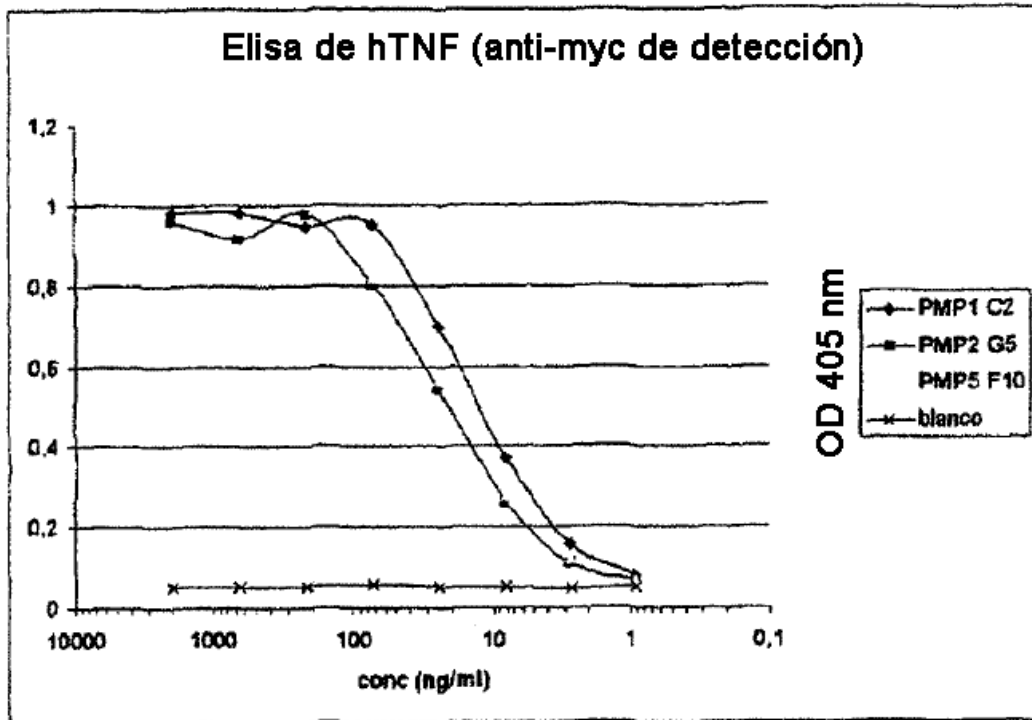


Figura 8

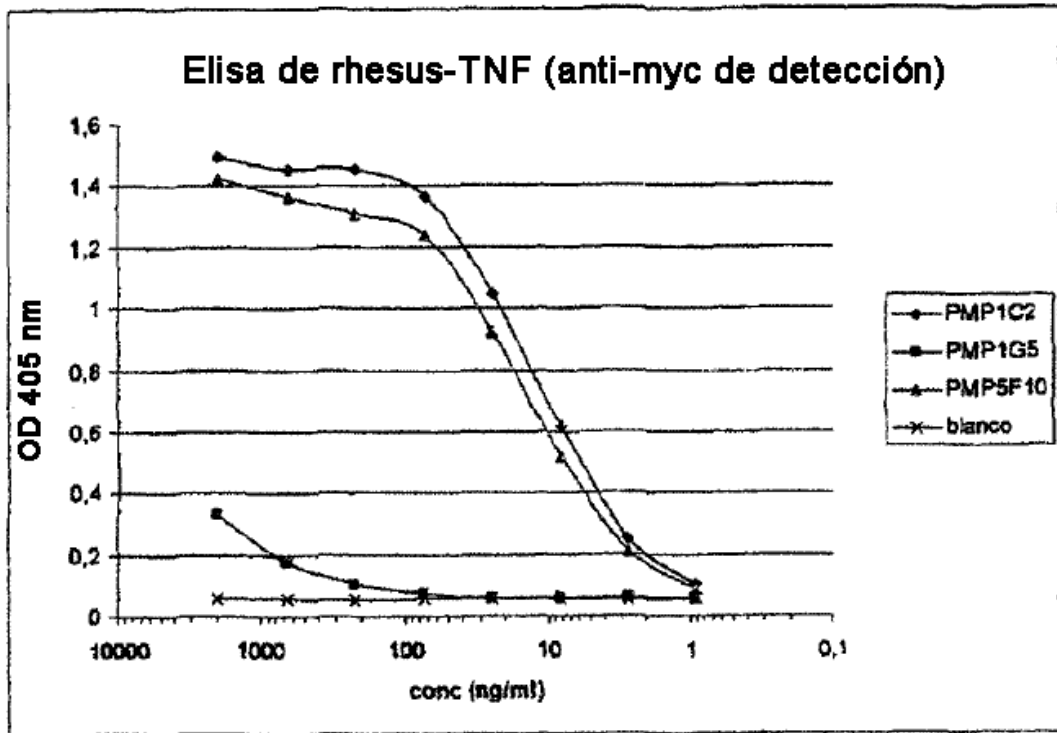


Figura 9

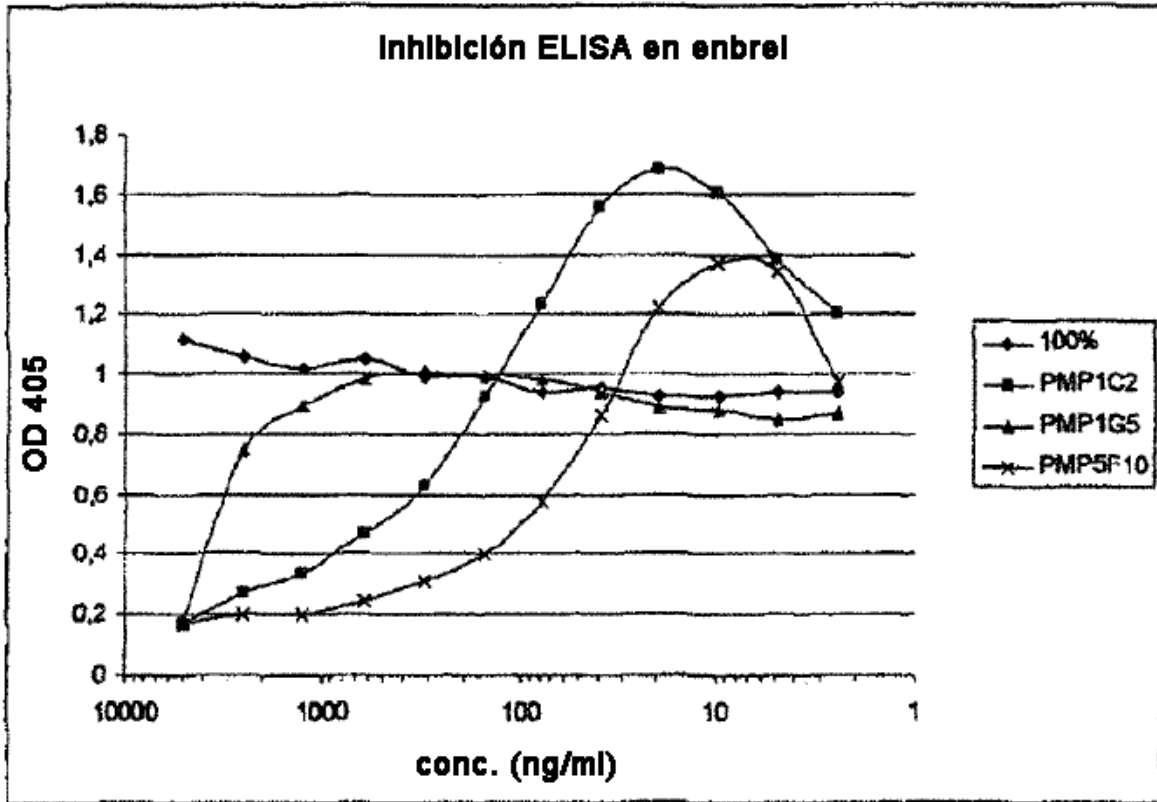


Figura 10

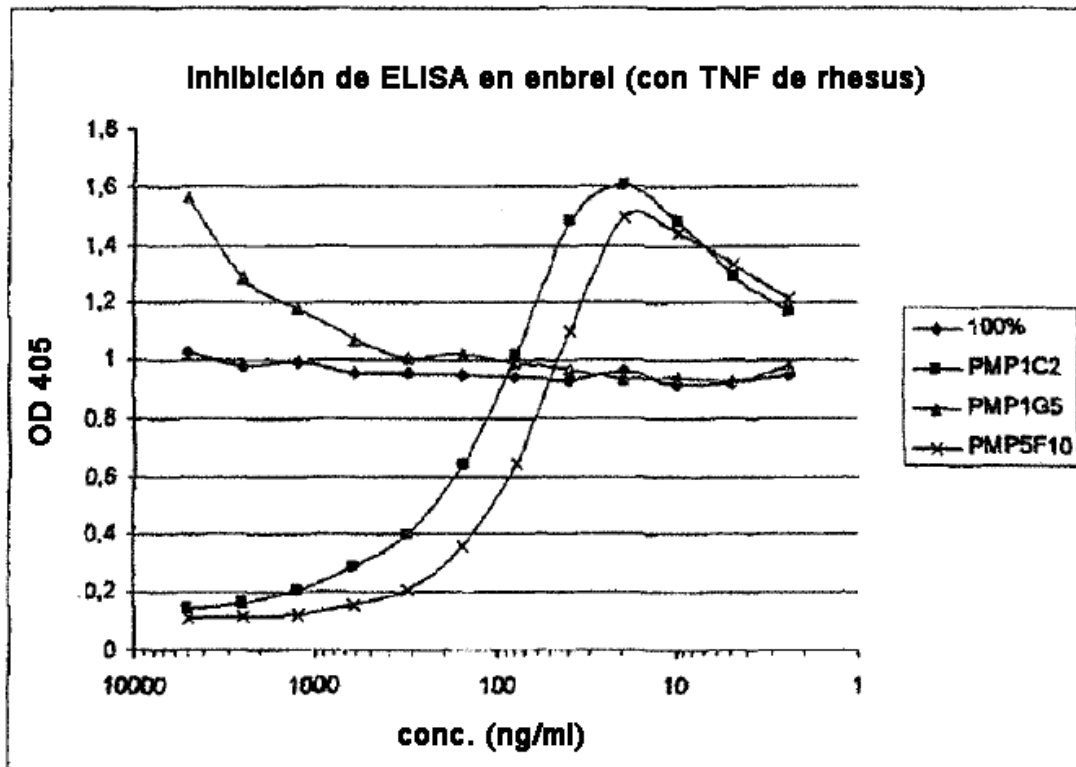
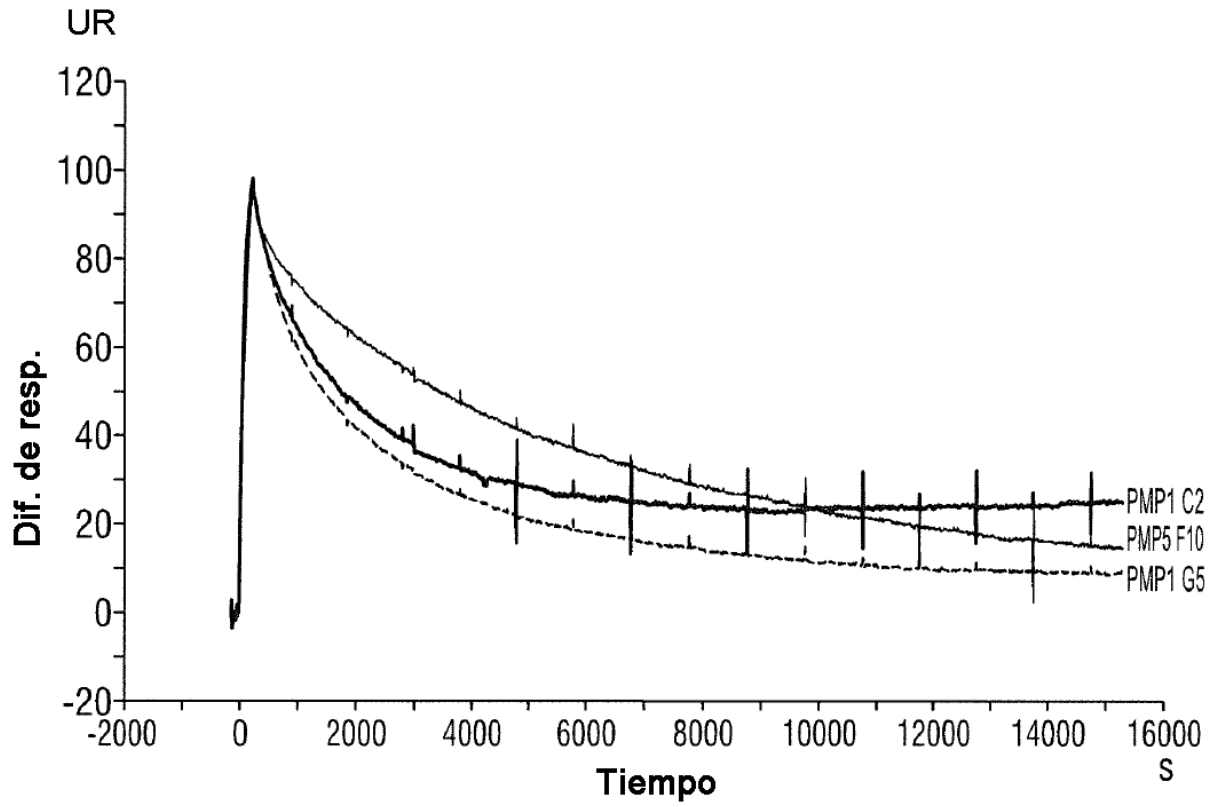


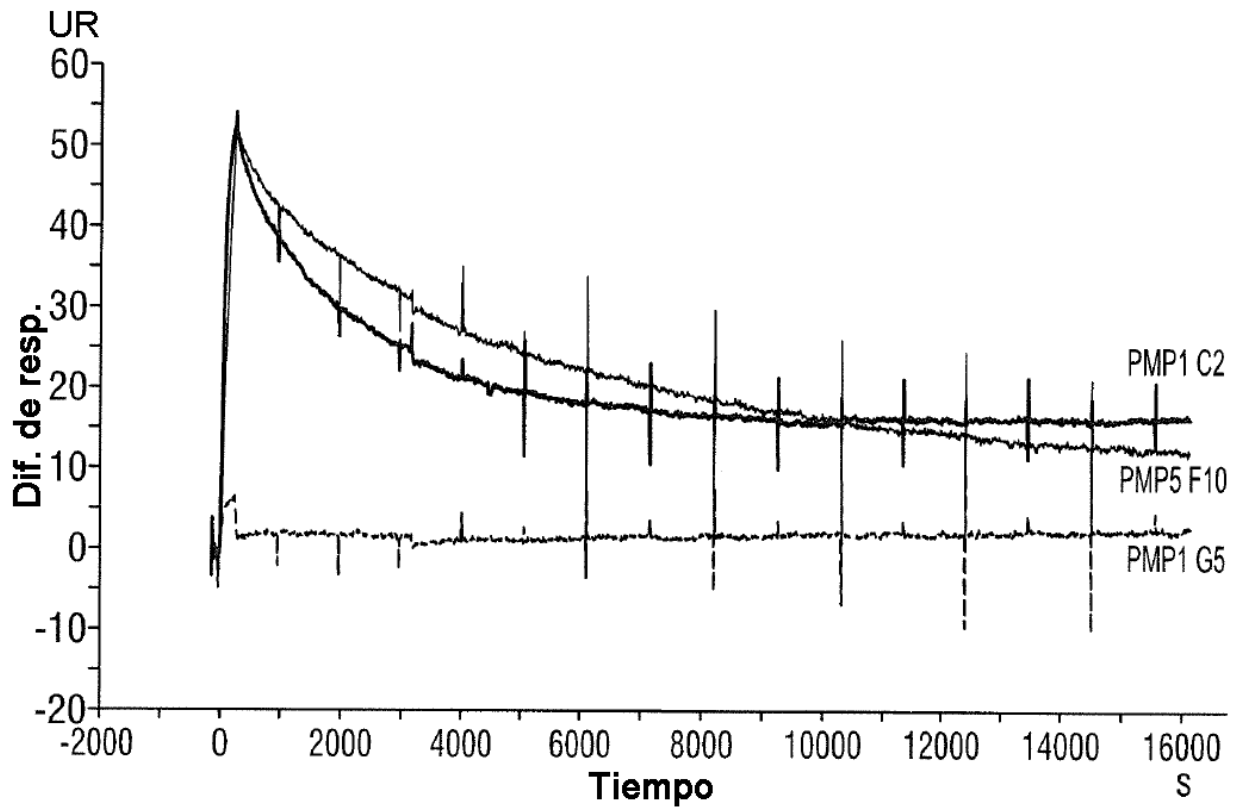
Figura 11

**PMP1C2, PMP1G5 y PMP5 F10 frente a TNF humano**  
**(datos normalizados)**



**Figura 12**

**PMP1C2, PMP1G5 y PMP5 F10 frente a TNF de rhesus**  
**(datos normalizados)**



**Figura 13**

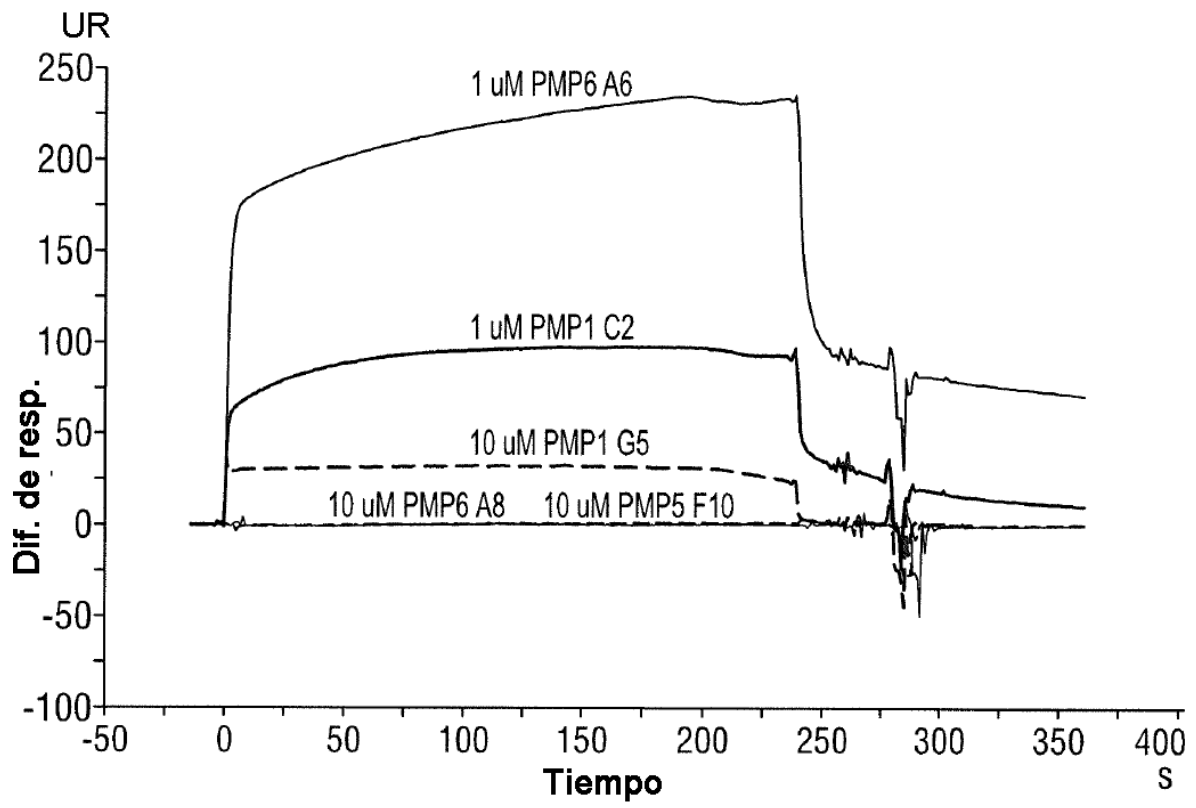


Figura 14



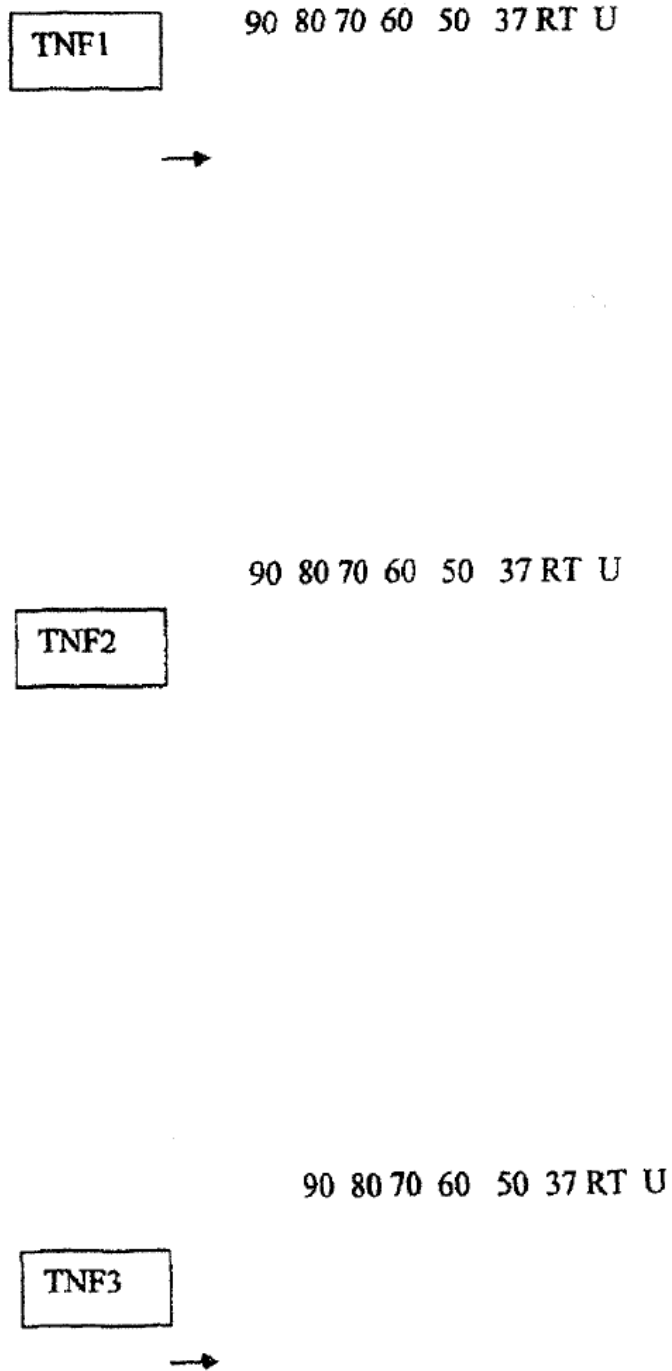
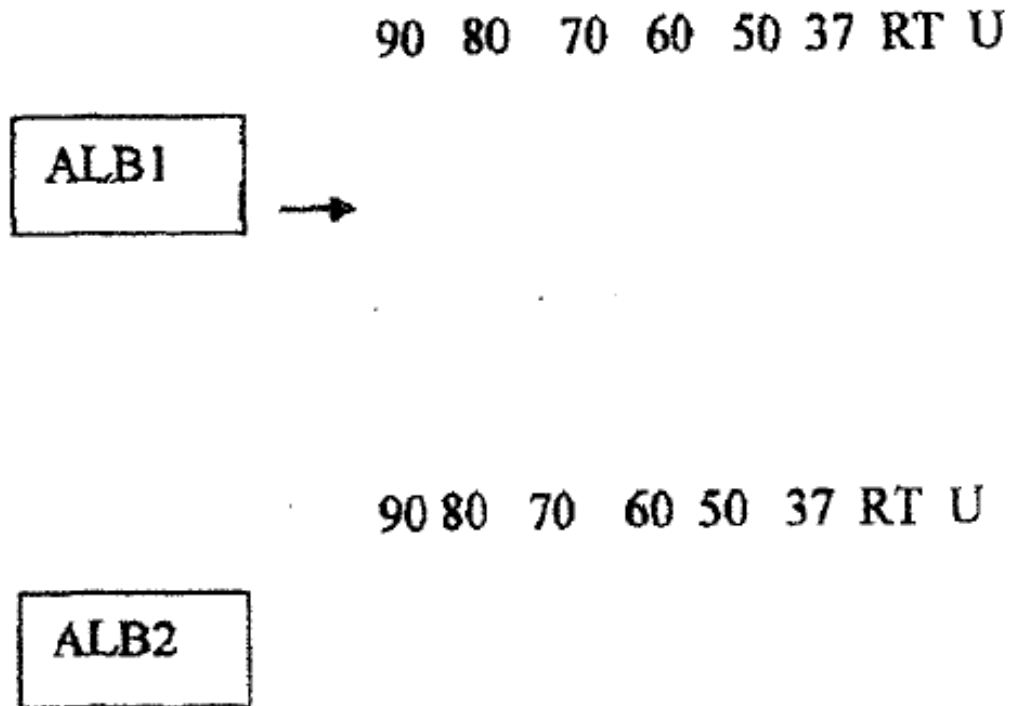


Figura 15



**Figura 15 - continuación**

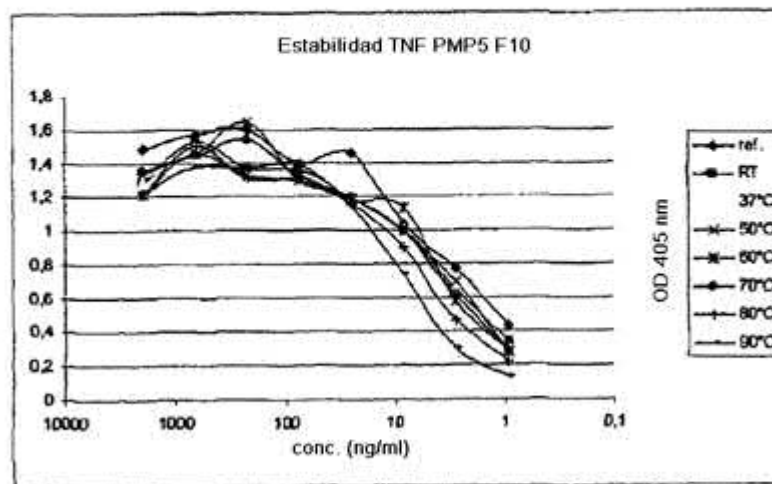
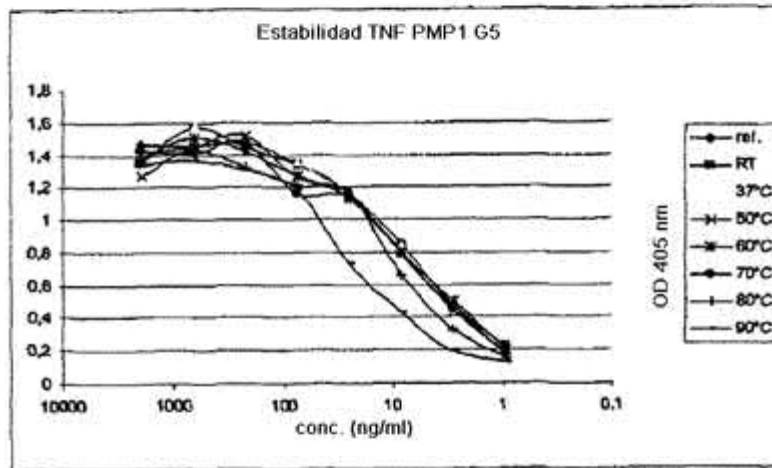
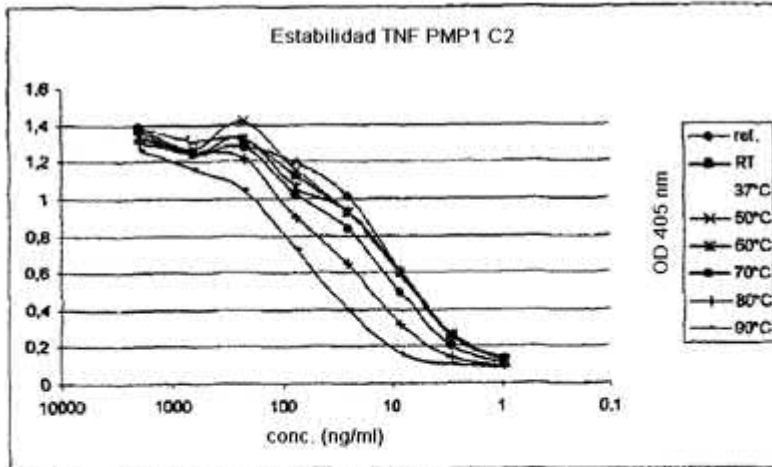


Figura 16

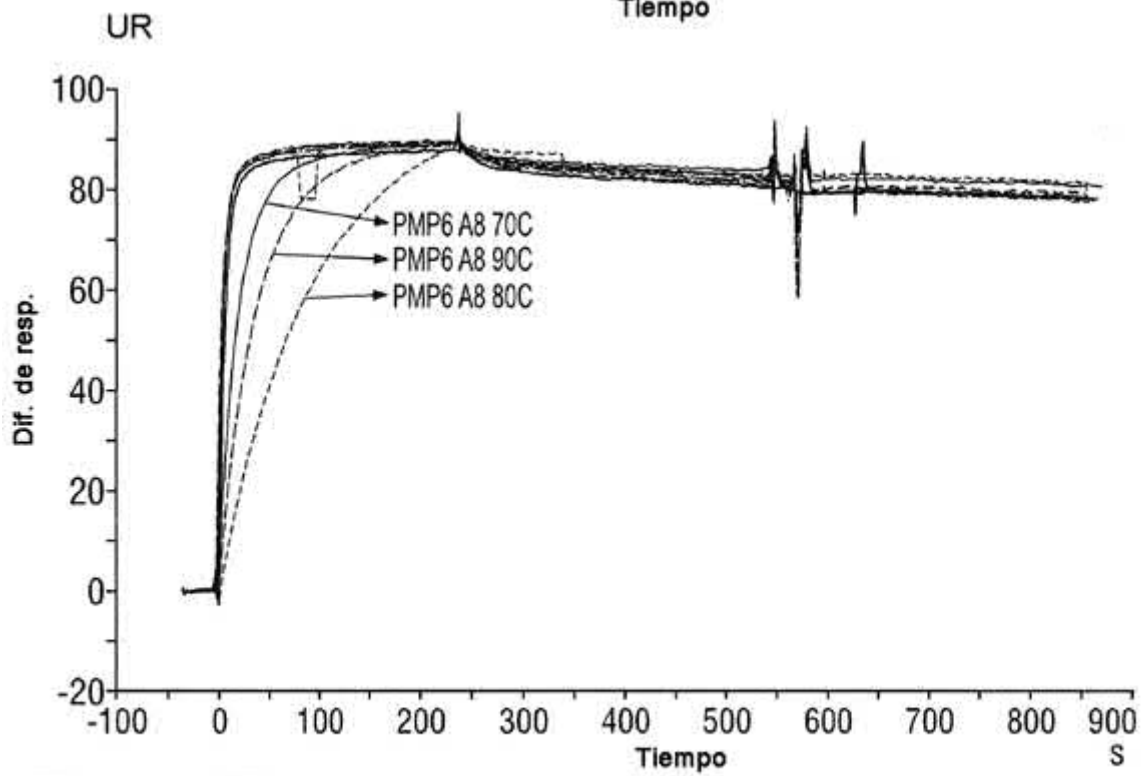
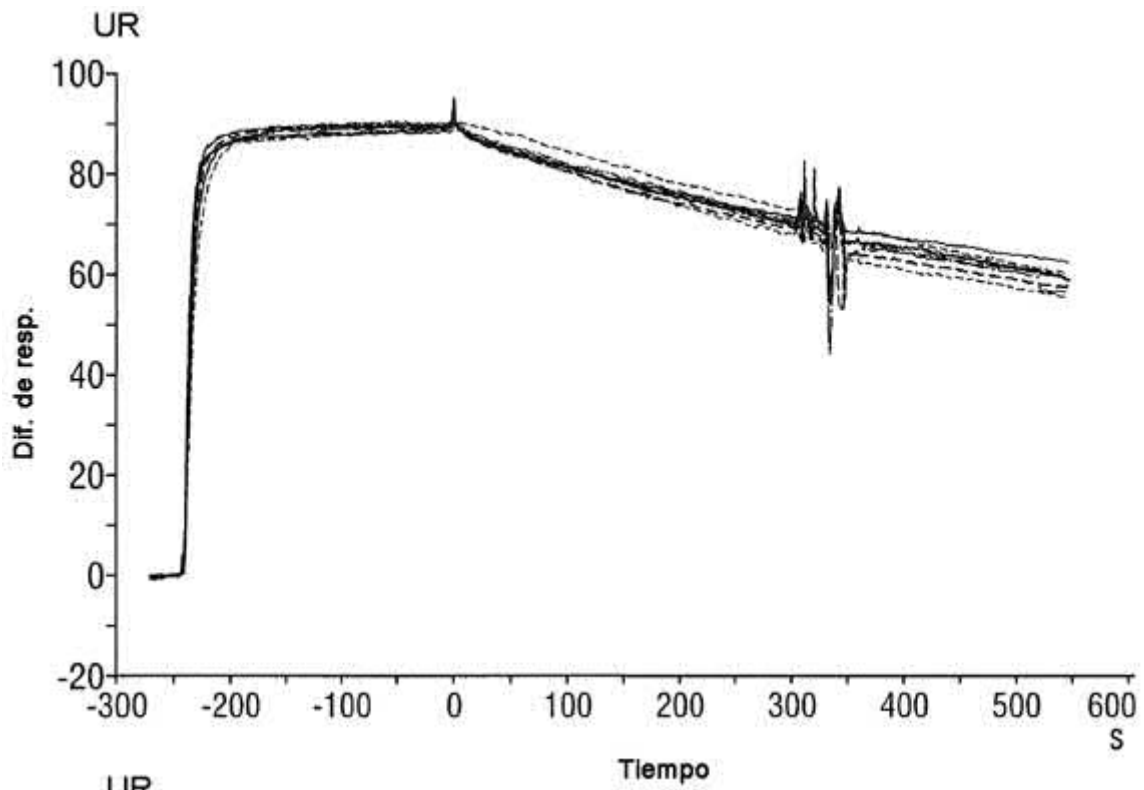
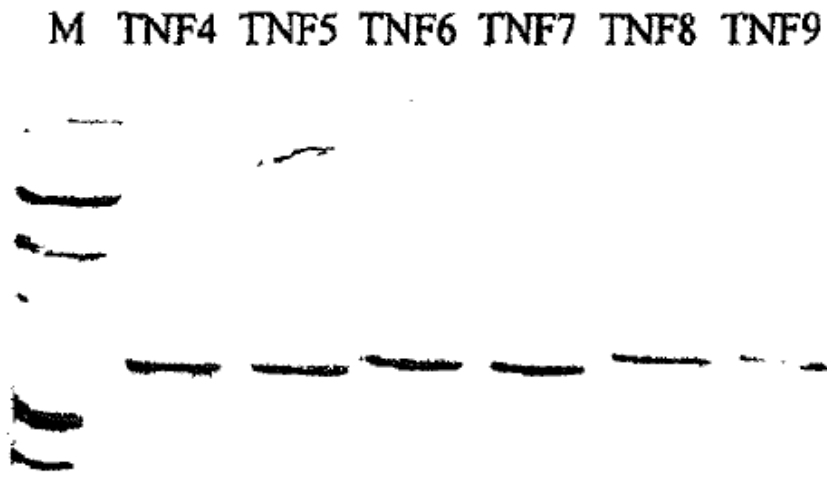


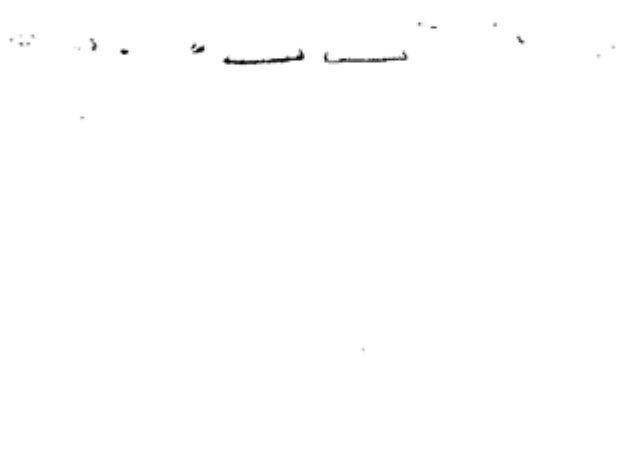
Figura 17



**Figura 18**

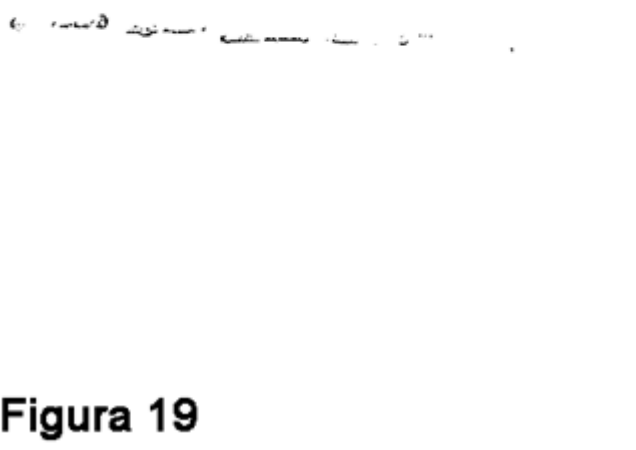
Anti-myc

TNF9 TNF8 TNF7 TNF6 TNF5 TNF4



Anti-NB

TNF9 TNF8 TNF7 TNF6 TNF5 TNF4



**Figura 19**

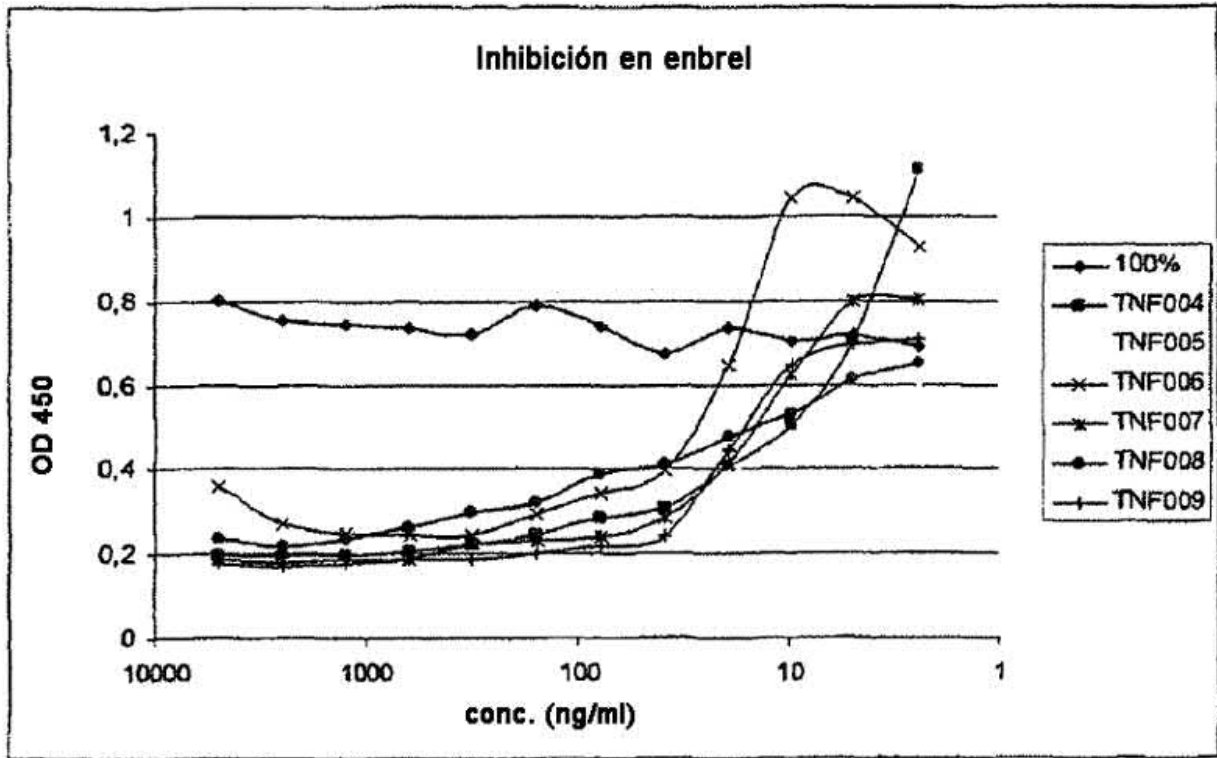


Figura 20

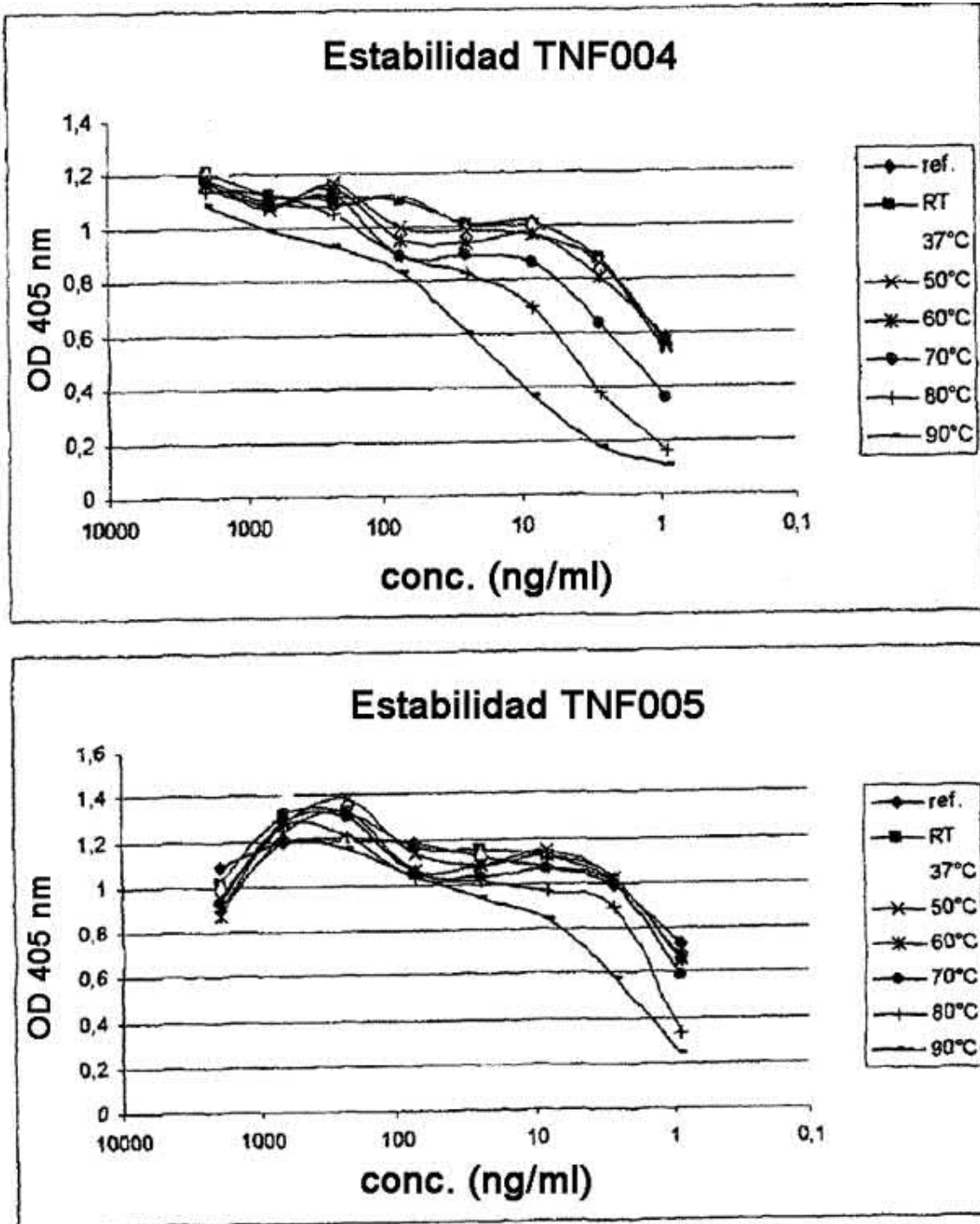


Figura 21



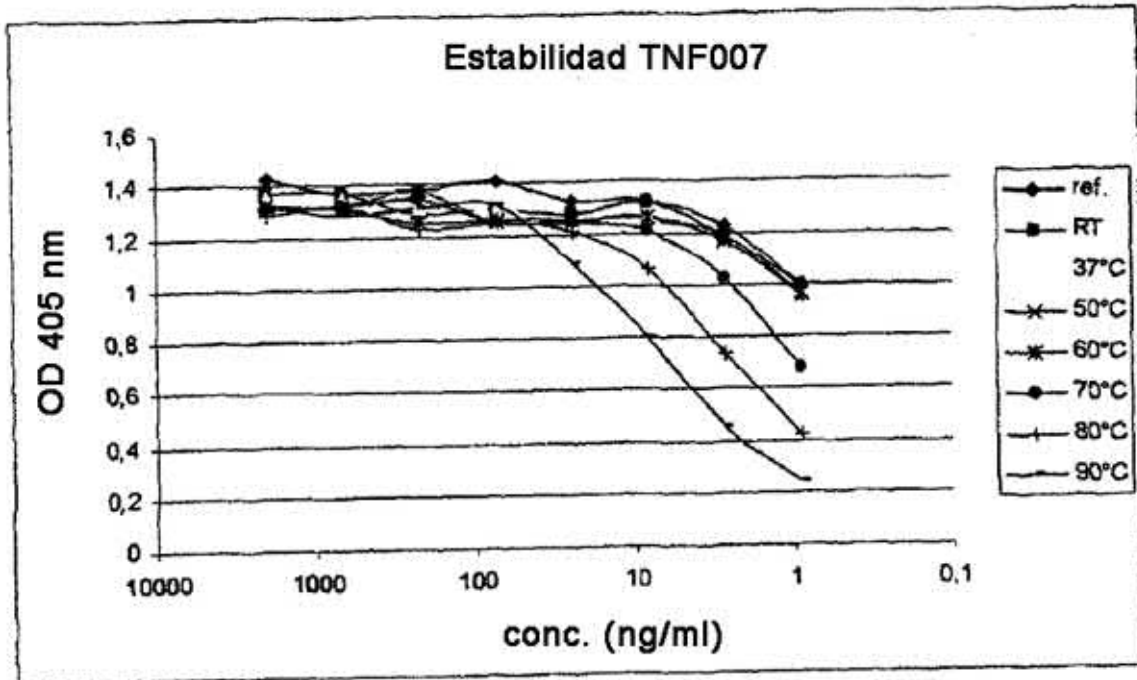
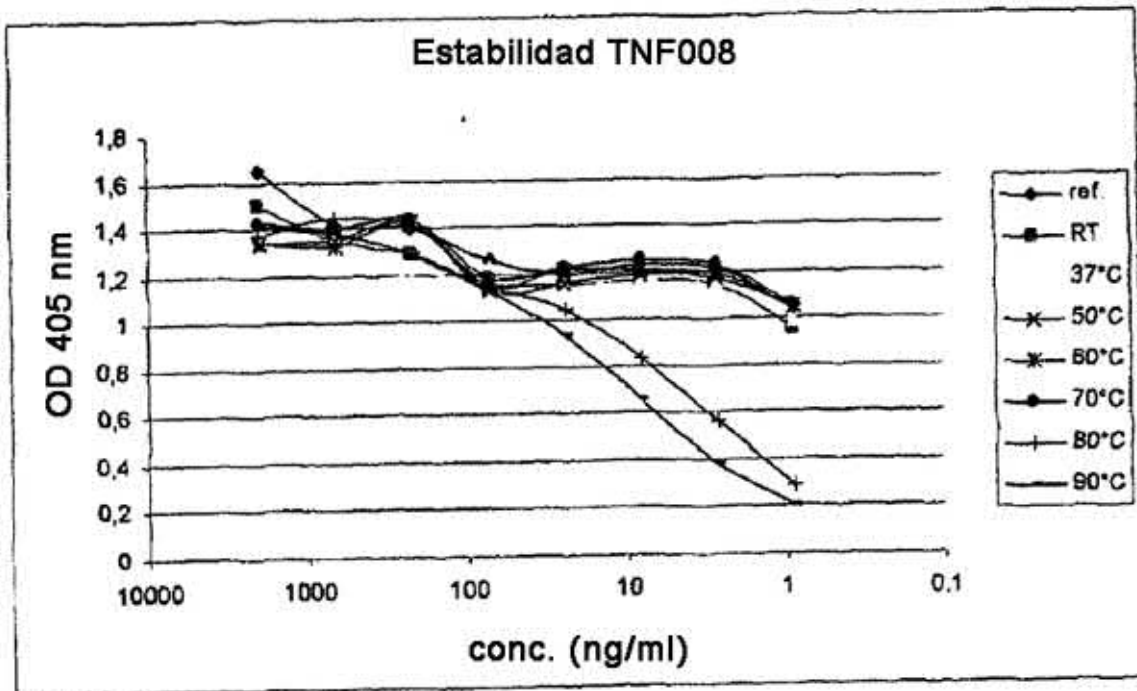


Figura 21 - continuación

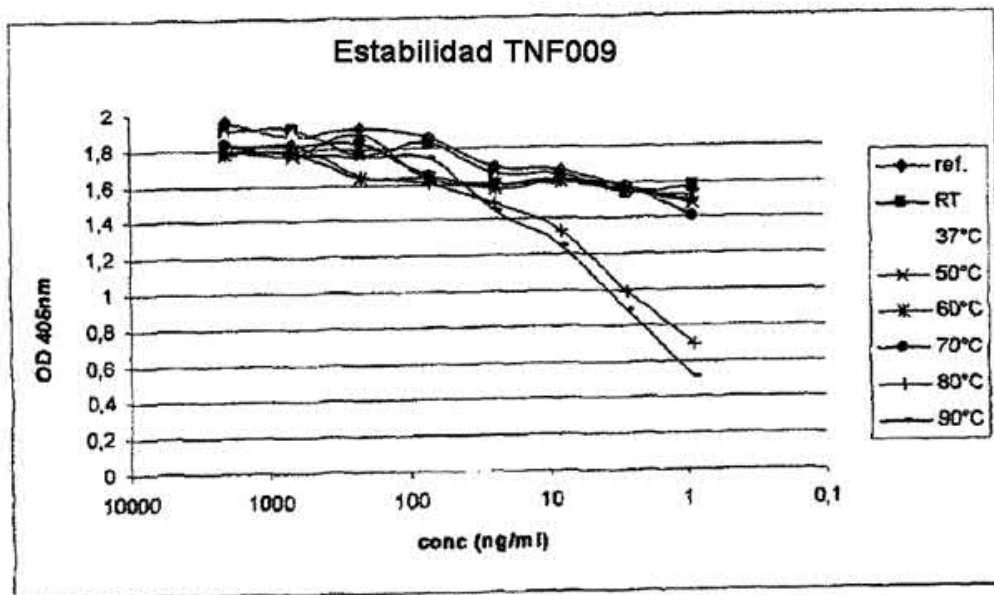
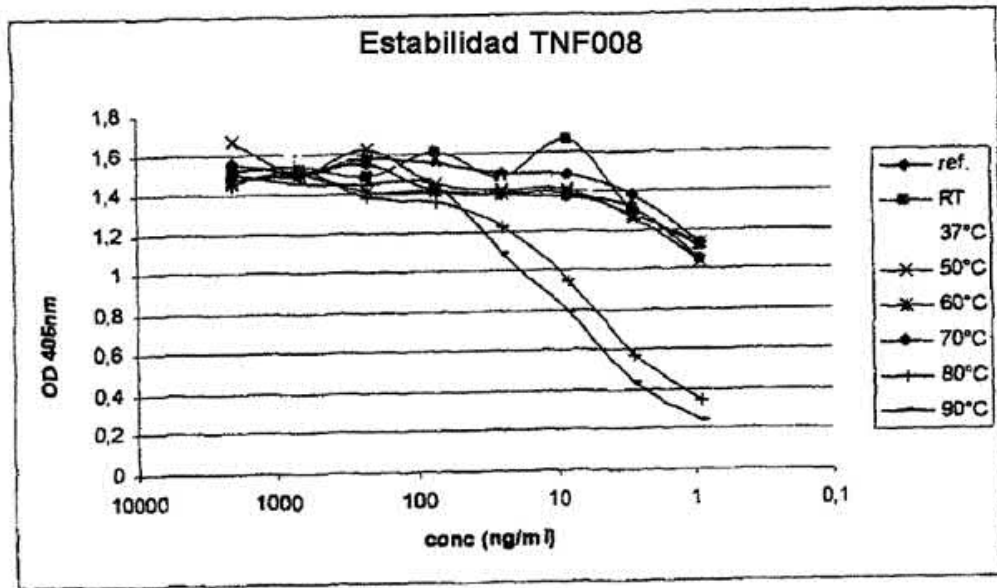


Figura 21 - continuación



```

ALB1:
DP51  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYSMN  WVRQAPGKGLEWVS  YISSSSSTIYYADSVKG
DP53  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYWMH  WVRQAPGKGLVWVS  RINSDGSSTSYADSVKG
ALB1  AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFR  SFGMS  WVRQAPGKEPEWVS  SISGSGSDTLYADSVKG
ALB3  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR  SFGMS  WVRQAPGKEPEWVS  SISGSGSDTLYADSVKG
ALB4  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SFGMS  WVRQAPGKEPEWVS  SISGSGSDTLYADSVKG
ALB5  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR  SFGMS  WVRQAPGKGLEWVS  SISGSGSDTLYADSVKG
*****
DP51  RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR  -----  WGQGTLVTVSS
DP53  RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  -----  WGQGTLVTVSS
ALB1  RFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI  GGSLSR  SSQGTQVTVSS
ALB3  RFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI  GGSLSR  SSQGTQVTVSS
ALB4  RFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI  GGSLSR  SSQGTQVTVSS
ALB5  RFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI  GGSLSR  SSQGTQVTVSS
*****

```

Figura 25

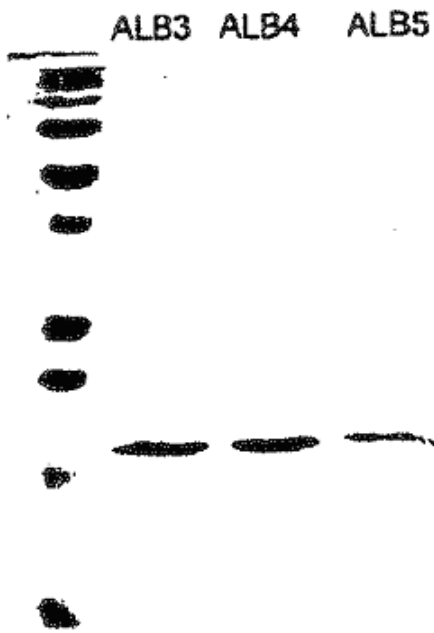
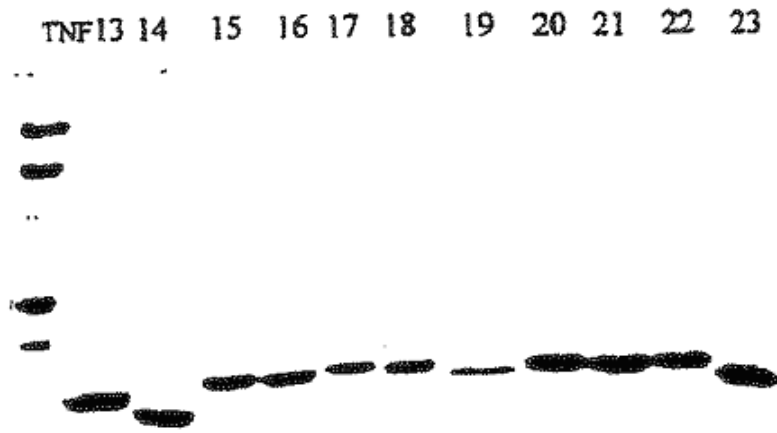


Figura 26

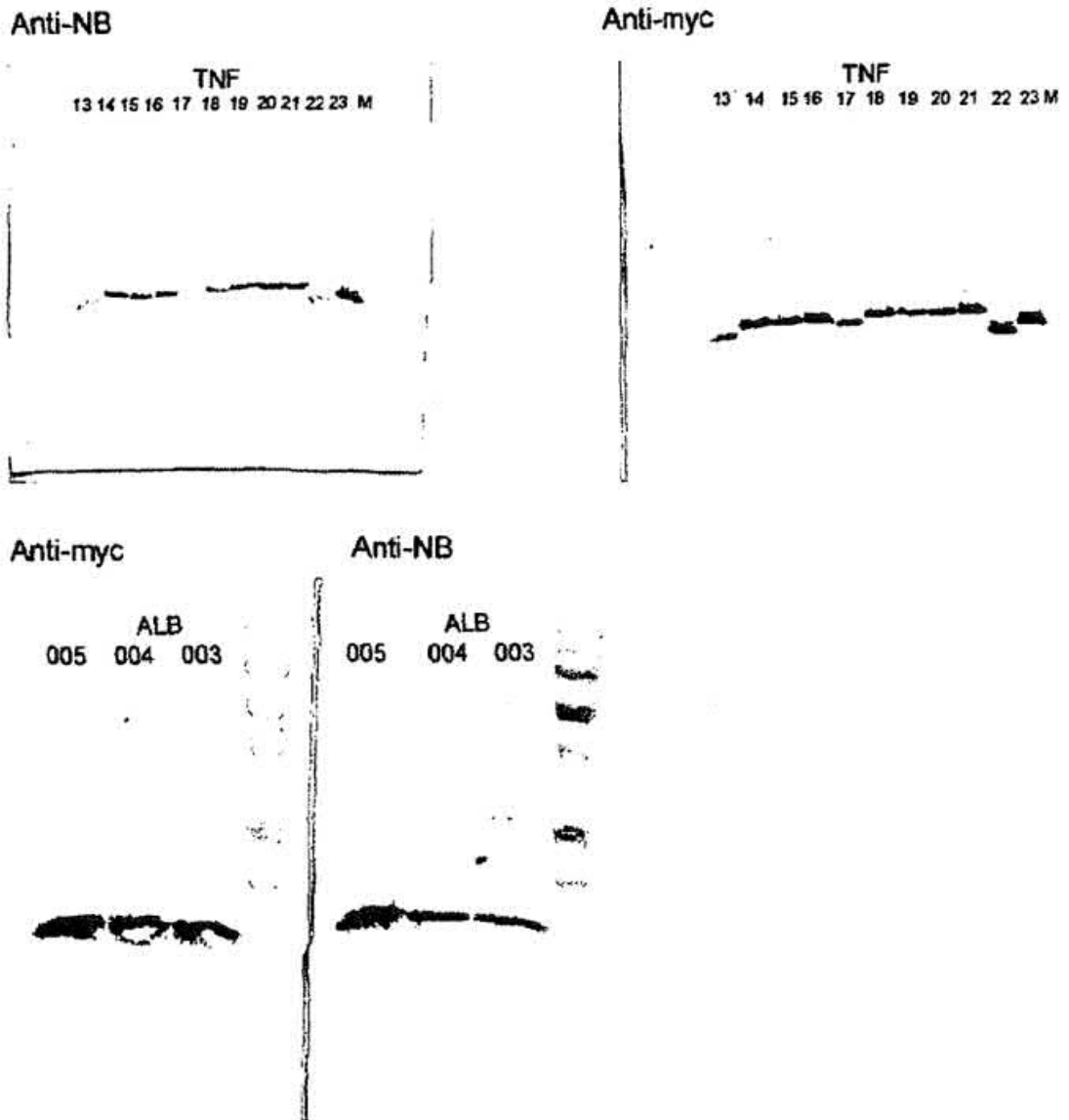


Figura 27

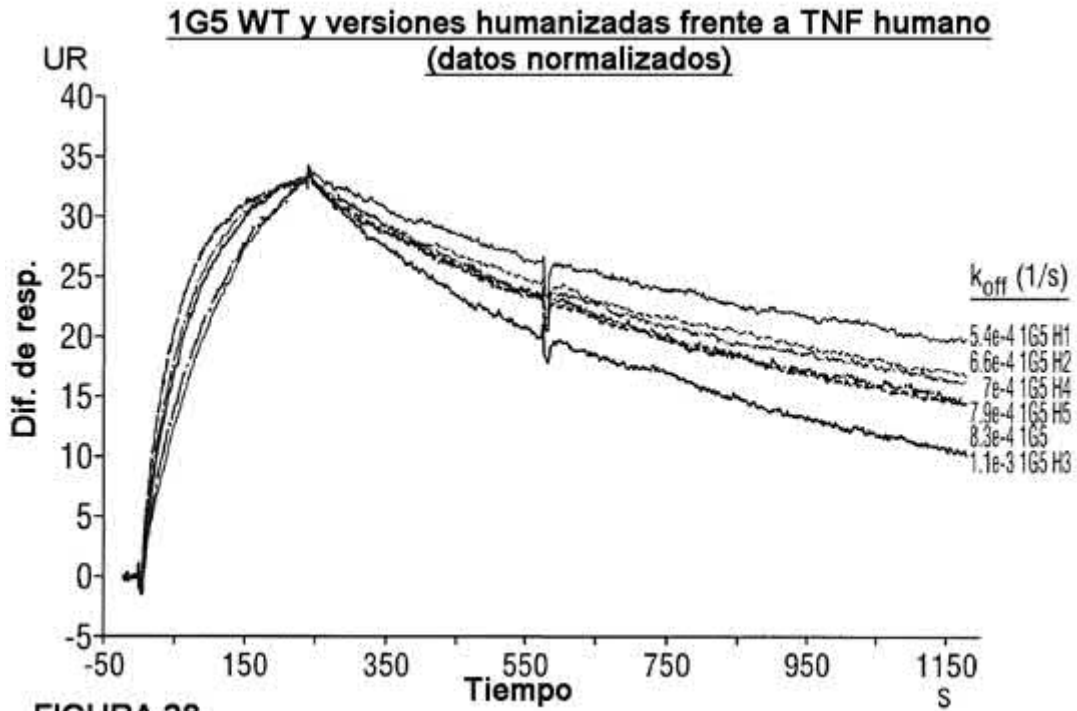


FIGURA 28

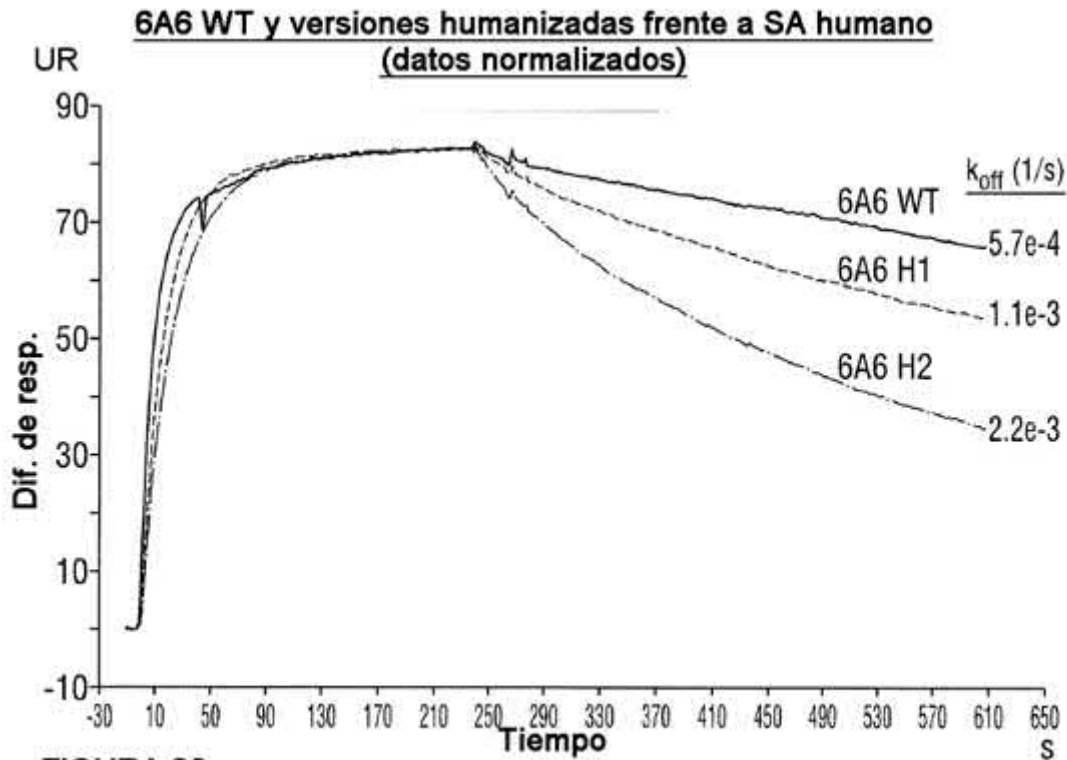


FIGURA 29

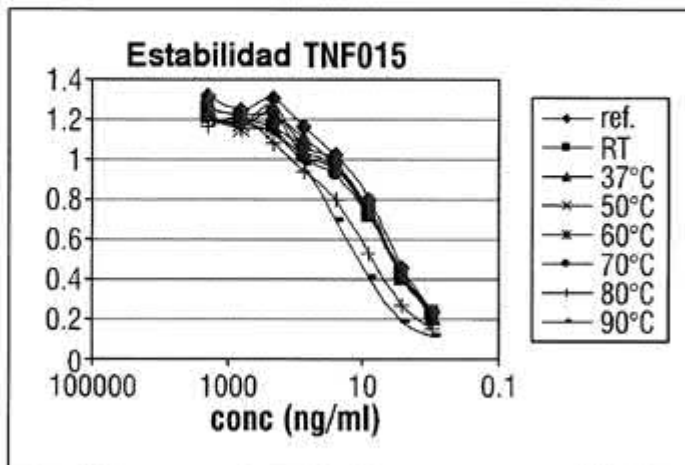
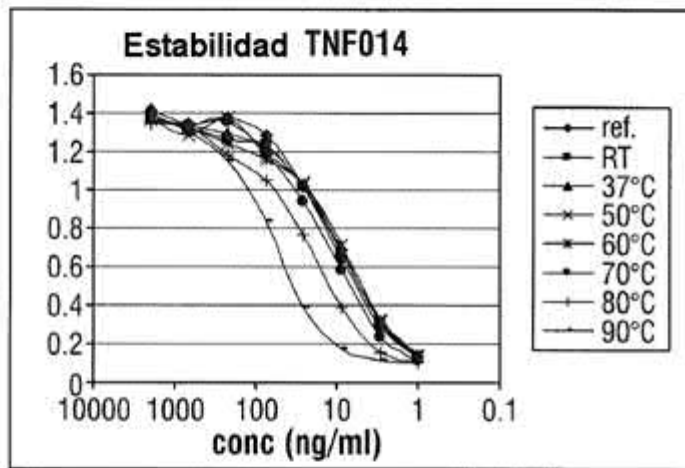
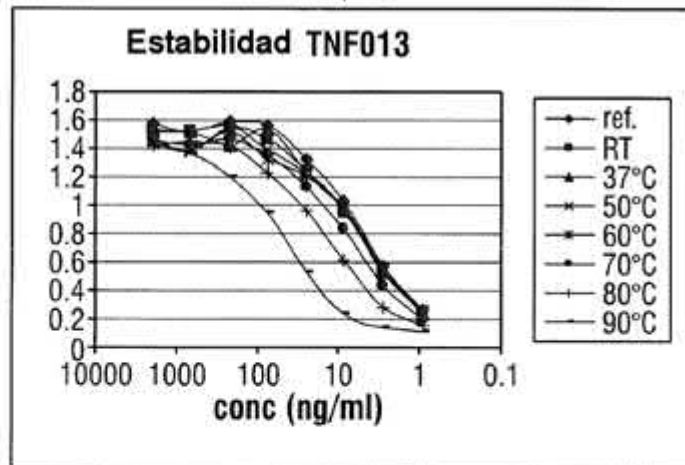


Figura 30



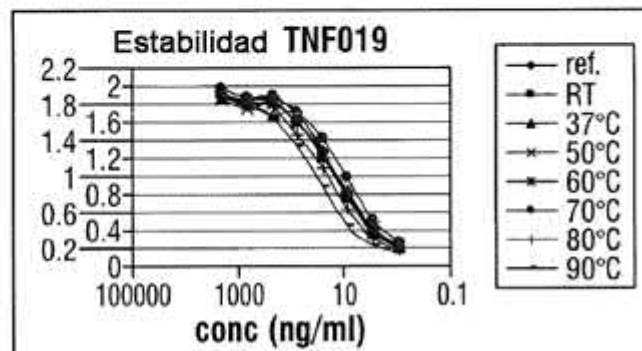
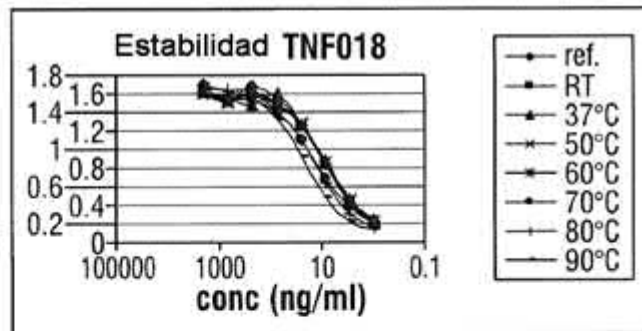
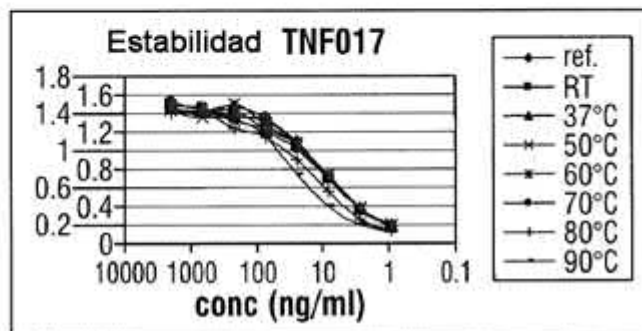
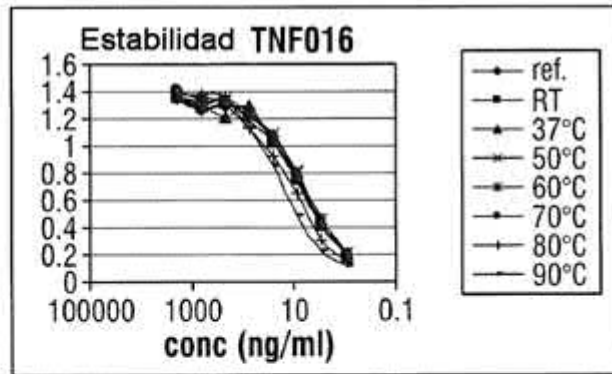


Figura 30 - continuación

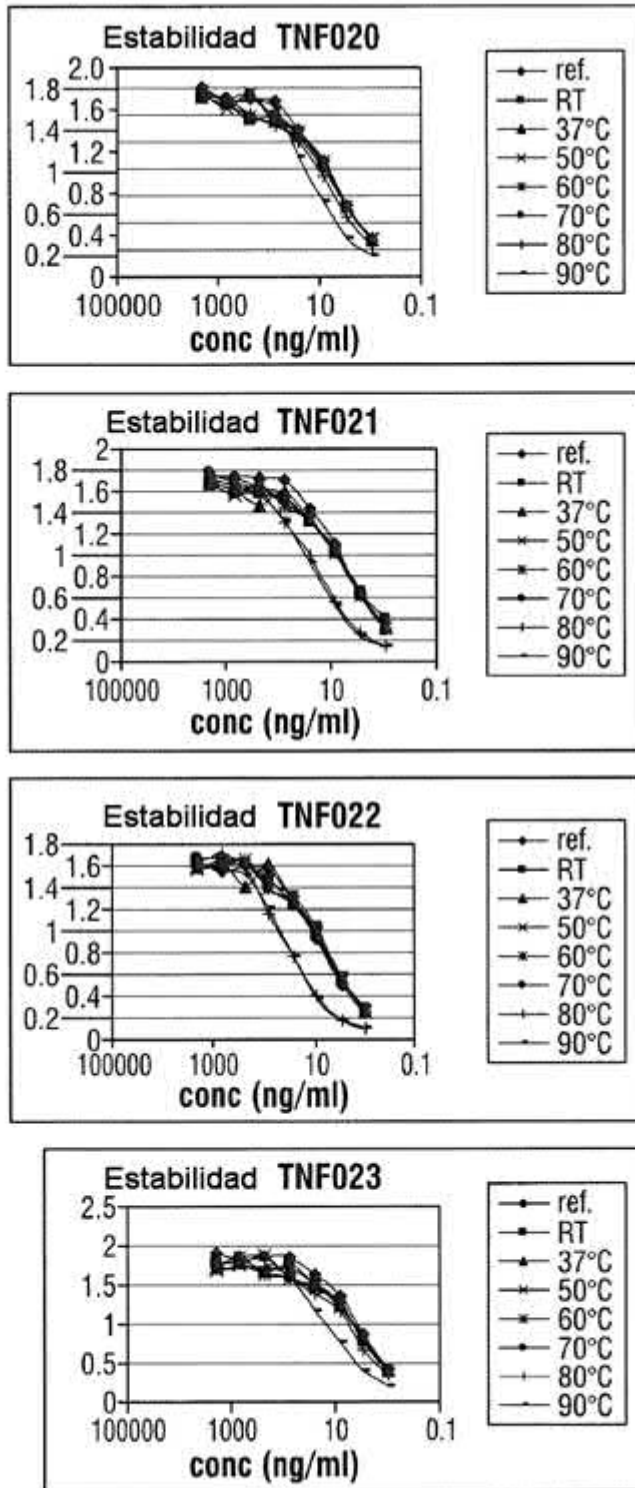


Figura 30 - continuación

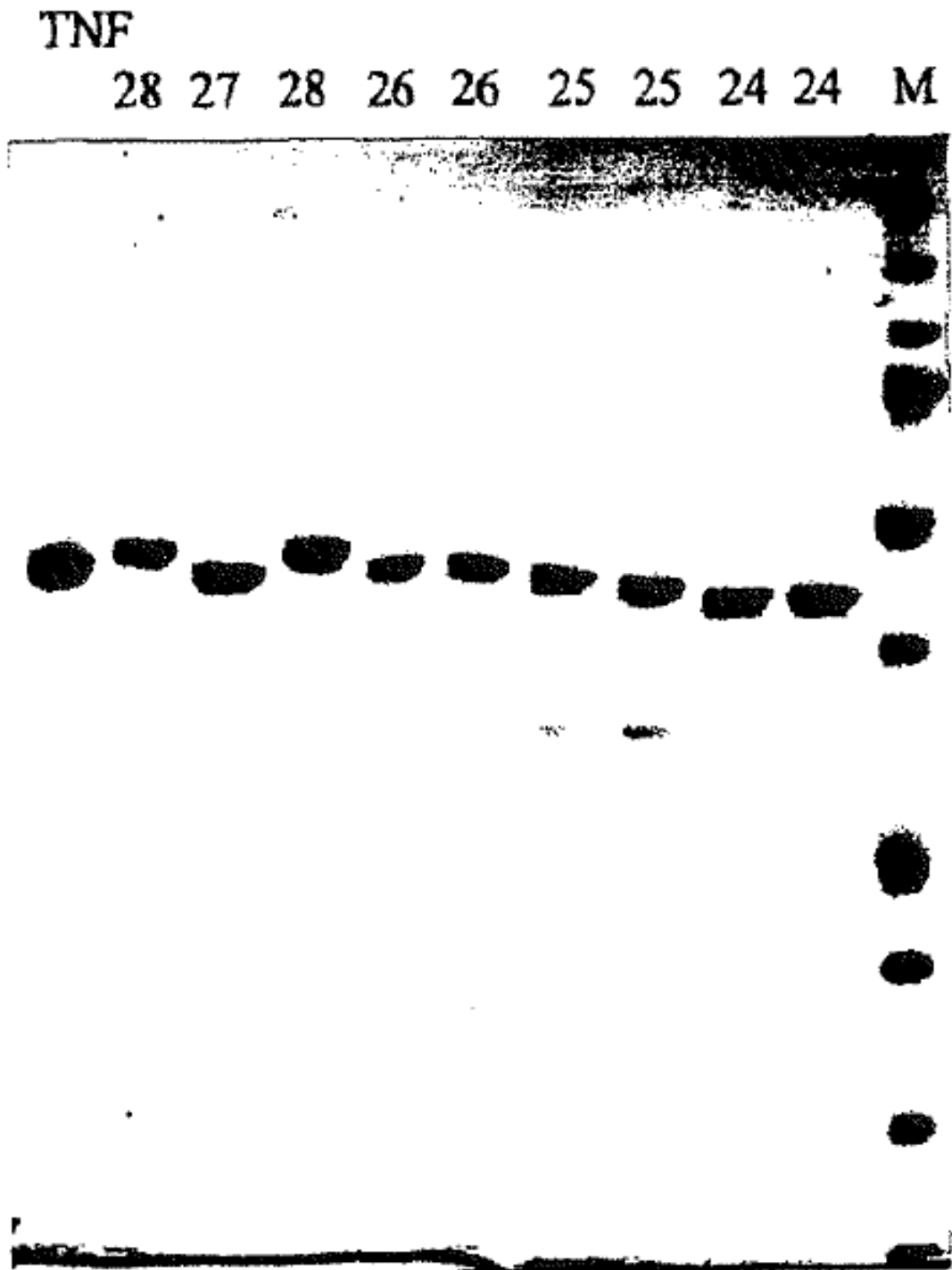


Figura 31

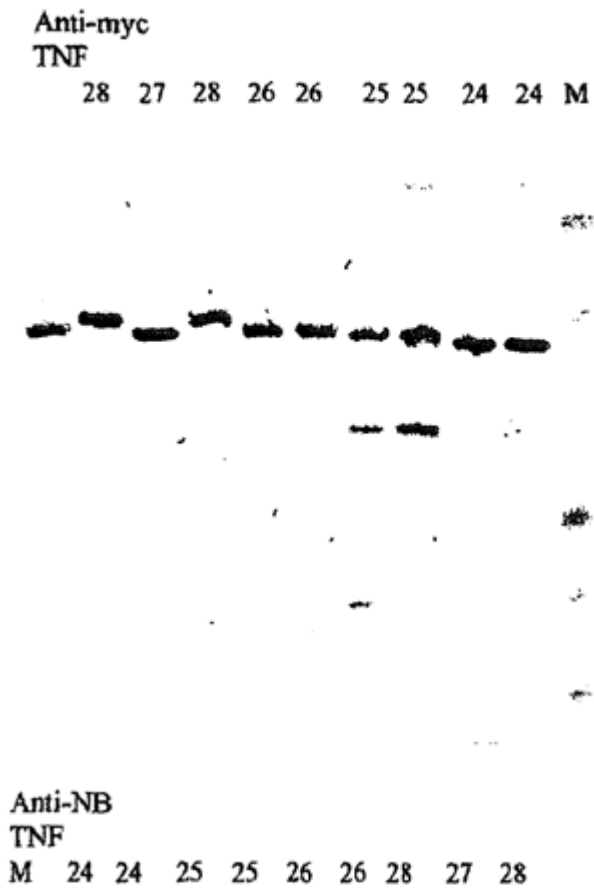


Figura 32

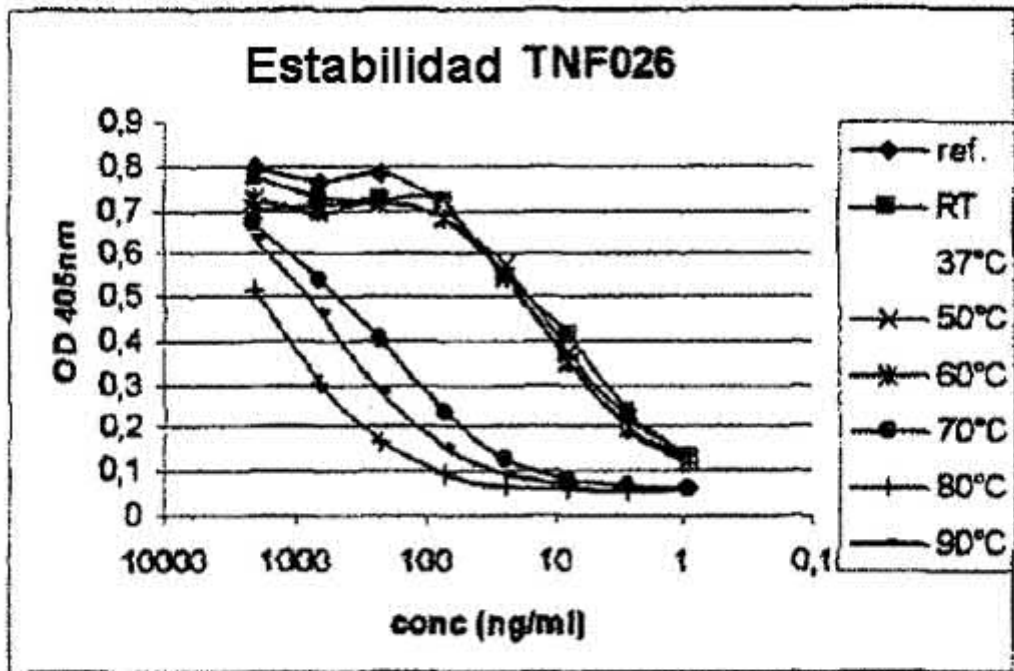
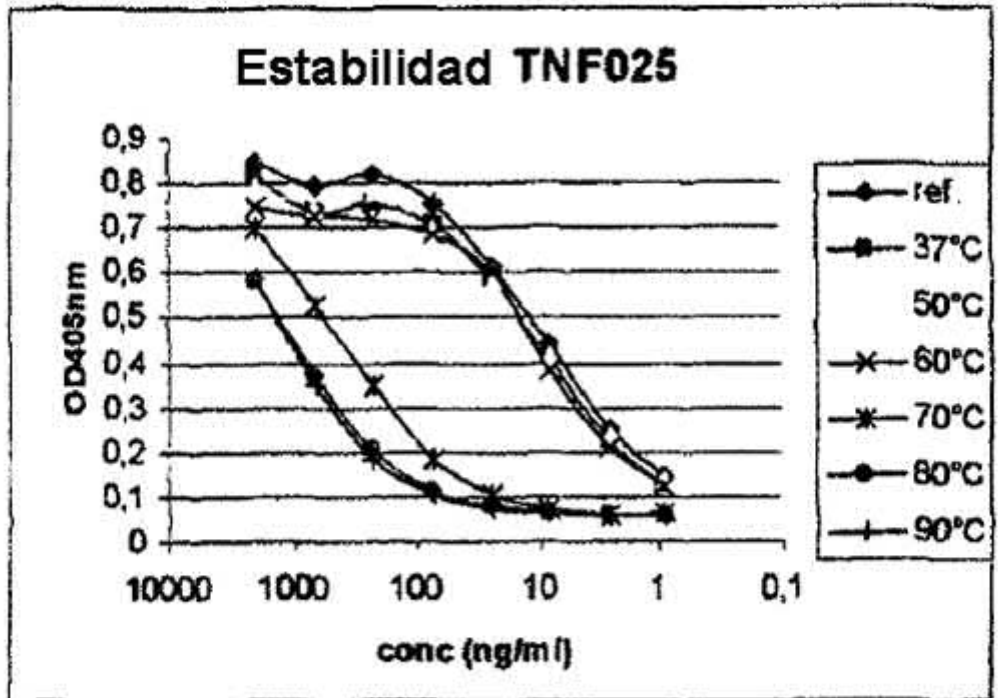


Figura 33

TNF1:  
 DP51 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMN WVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYY  
 DP53 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMH WVRQAPGKGLVWVS RINSDGSSTSY  
 TNF1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY  
 TNF13 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY  
 TNF14 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY  
 TNF29 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY  
 TNF30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYWMY WVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKY  
 e

DP51 ADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR ----- WGQGTQVTVSS  
 DP53 ADSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ----- WGQGTQVTVSS  
 TNF1 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGTQVTVSS  
 TNF13 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGTQVTVSS  
 TNF14 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGTQVTVSS  
 TNF29 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGTQVTVSS  
 TNF30 PDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAR SPSGFN RGQGTQVTVSS  
 ii b e

Figura 34

TNF2:  
 DP54 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -----SYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYY  
 TNF2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY  
 TNF15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYY  
 TNF16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYY  
 TNF17 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYY  
 TNF18 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYY  
 TNF19 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYY  
 TNF31 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY  
 TNF32 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS EPSGYTYTIG WFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYY  
 e i e b ei b

DP54 VDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ----- WGQGTQVTVSS  
 TNF2 ADSVKG RFTISRDIAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 TNF15 ADSVKG RFTISRDIAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 TNF16 ADSVKG RFTISRDIAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 TNF17 ADSVKG RFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 TNF18 ADSVKG RFTISRDIAKNTVDLQMNSLRPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 TNF19 ADSVKG RFTISRDIAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 TNF31 ADSVKG RFTISRDIAKNTVDLQMNSLRPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 TNF32 ADSVKG RFTISRDIAKNTVDLQMNSLRPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVGSYNY WGQGTQVTVSS  
 e bbb b ii b e

Figura 35

TNF3:  
 DP29 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFS DHYMD WVRQAPGKGLEWVG RTRNKANSYTTTEYAAS  
 TNF3 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRSLS NYVMG WFRQAPGKERELLG NI--SWRGYNIYYKDS  
 TNF20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS  
 TNF21 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS  
 TNF22 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS  
 TNF23 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS  
 TNF33 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRSLS NYVMG WFRQAPGKGRELLG NI--SWRGYNIYYKDS  
                   i    i    i    ebi                    b                    ei bb

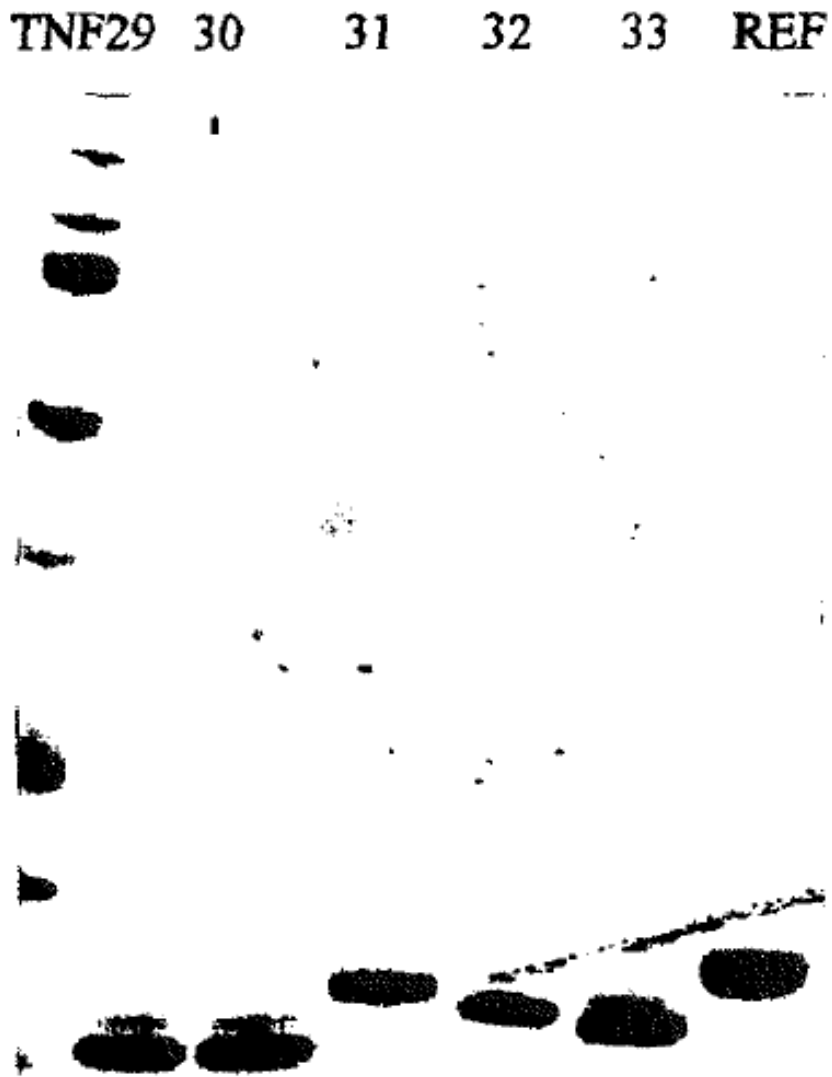
DP29 VKG RFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCAR ----- WGQGLVTVSS  
 TNF3 VKG RFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS  
 TNF20 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS  
 TNF21 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS  
 TNF22 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSKTEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS  
 TNF23 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGTQVTVSS  
 TNF33 VKG RFTISRDDSKNTIYLQMNLSRPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTY WGQGLVTVSS  
                           e   bb            i   ii                    b                                    e

Figura 36

ALB1:  
 DP51 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFS SYSMN WVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYYADSVKG  
 DP53 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFS SYWMH WVRQAPGKGLVWVS RINSDDGSSSTIYADSVKG  
 ALB1 AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCLASGFTFR SFGMS WVRQAPGKEPEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFR SFGMS WVRQAPGKEPEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFS SFGMS WVRQAPGKEPEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFR SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB6 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCLASGFTFR SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB7 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCLASGFTFR SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB8 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCLASGFTFS SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB9 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCLASGFTFS SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
 ALB10 EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCLASGFTFS SFGMS WVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKG  
                   e                    i                    i                                    ei

DP51 RFTISRDNKNSLYLQMNLSRDEDTAVYYCAR ----- WGQGLVTVSS  
 DP53 RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR ----- WGQGLVTVSS  
 ALB1 RFTISRDNAKTTLYLQMNLSKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB3 RFTISRDNAKTTLYLQMNLSKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB4 RFTISRDNAKTTLYLQMNLSKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB5 RFTISRDNAKTTLYLQMNLSKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB6 RFTISRDNAKTTLYLQMNLSKPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB7 RFTISRDNAKTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB8 RFTISRDNAKTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB9 RFTISRDNAKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
 ALB10 RFTISRDNAKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTI GGSLSR SSQGTQVTVSS  
                           i                    ii                    bb                    ib                    i

Figura 37



**Figura 38**



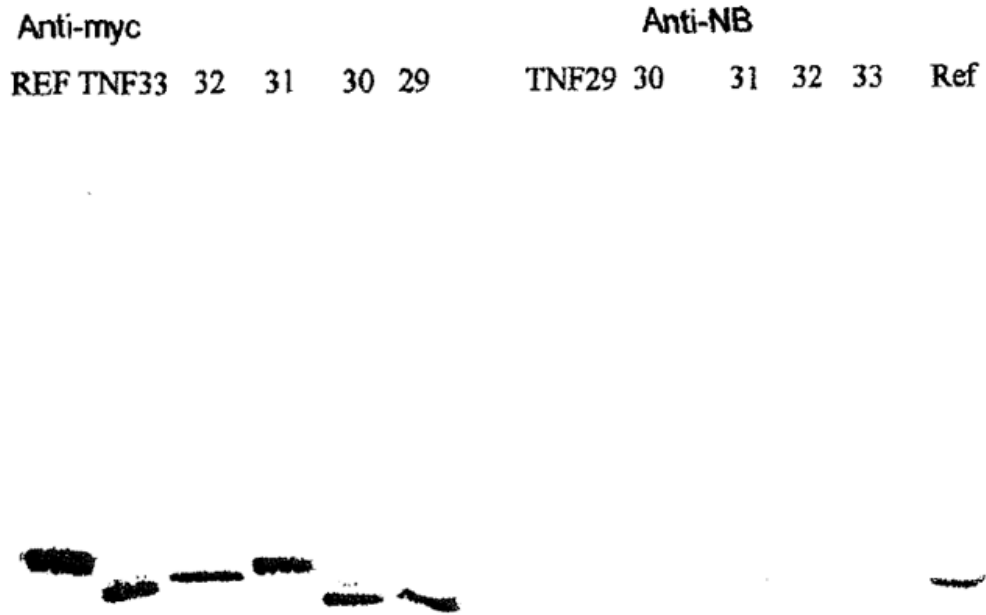


Figura 39

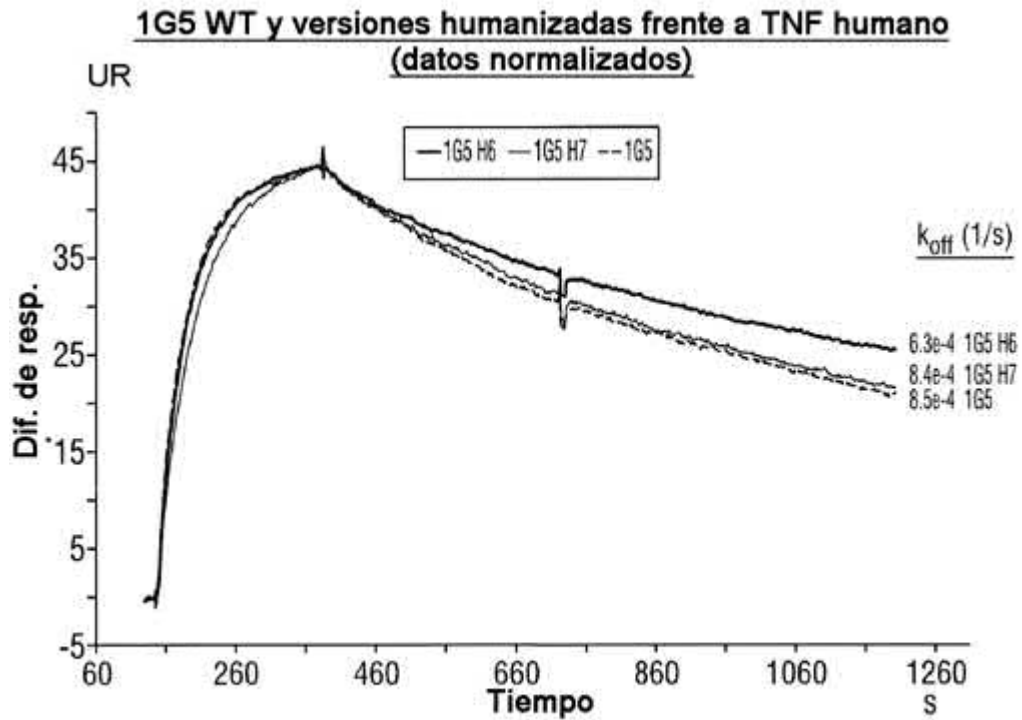
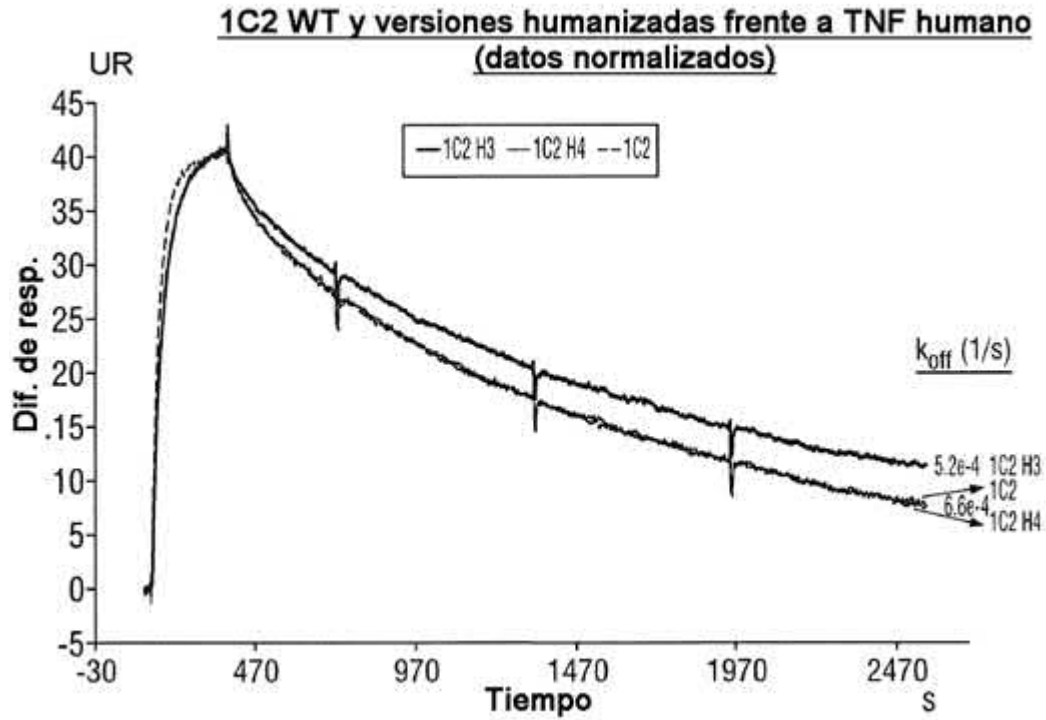


Figura 40

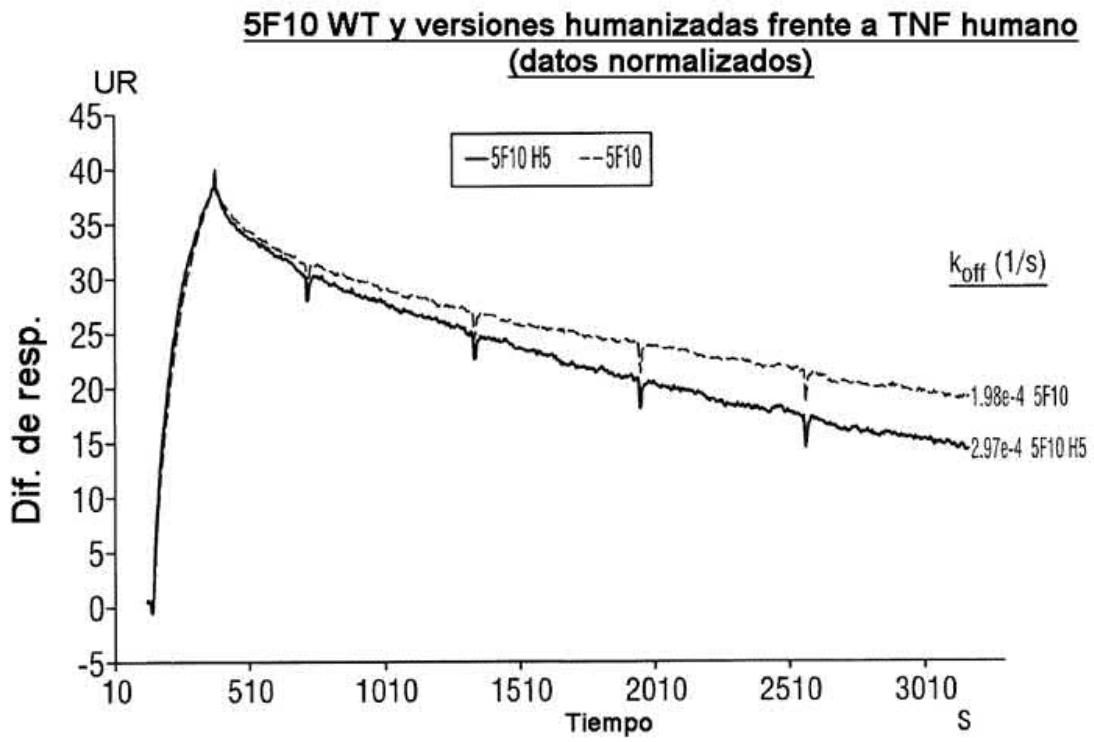


Figura 40 - continuación

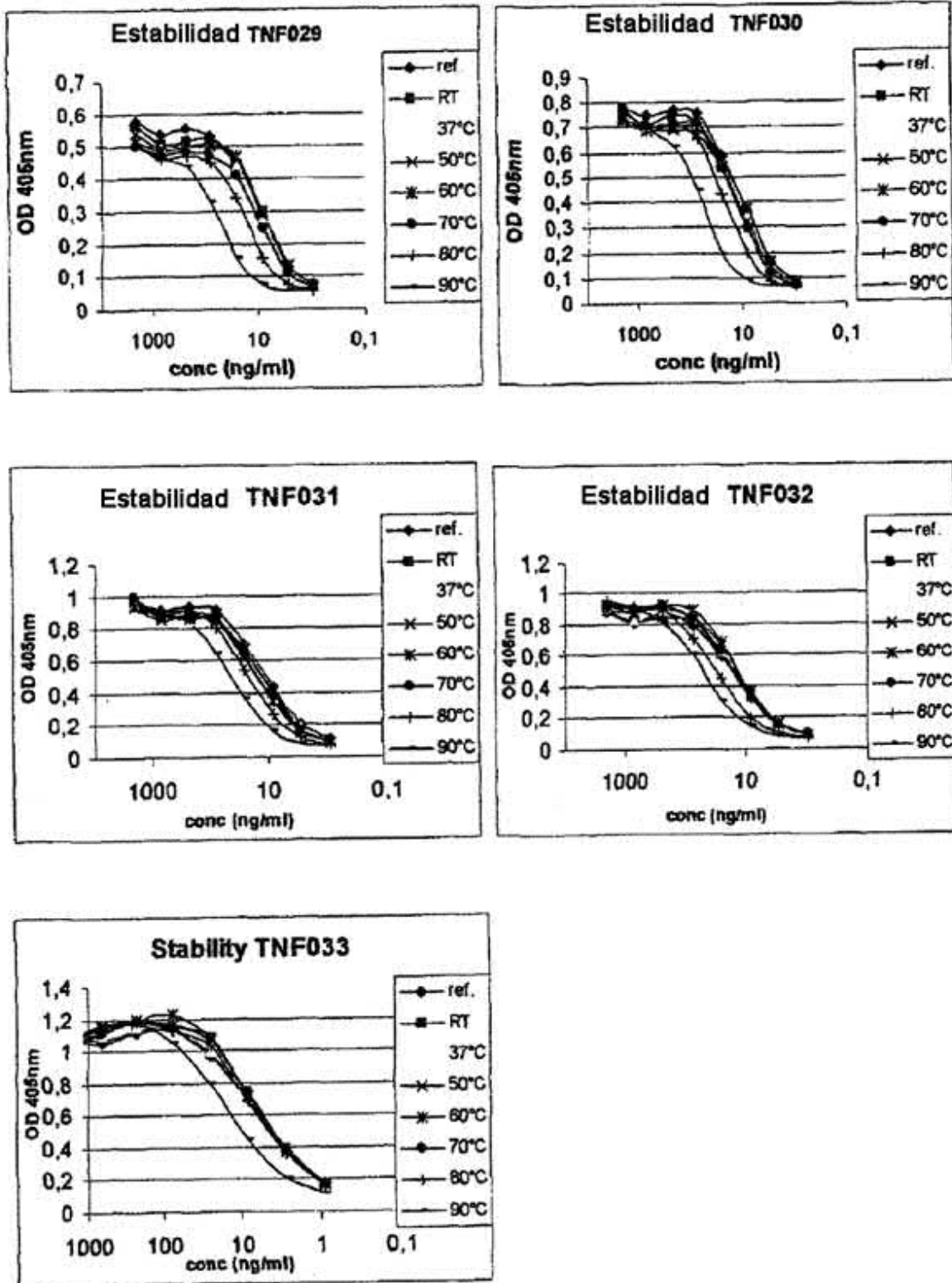


Figura 41



Figura 42

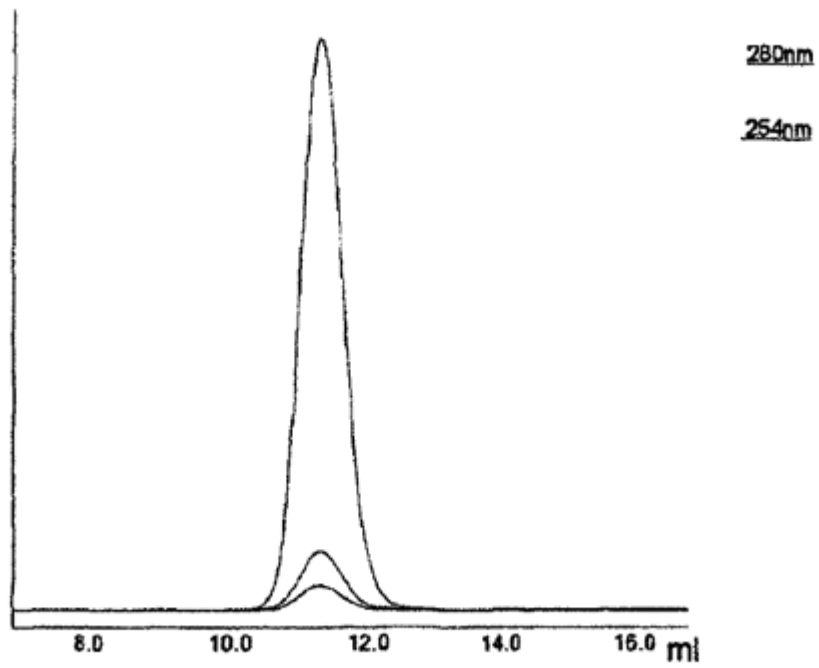


Figura 43

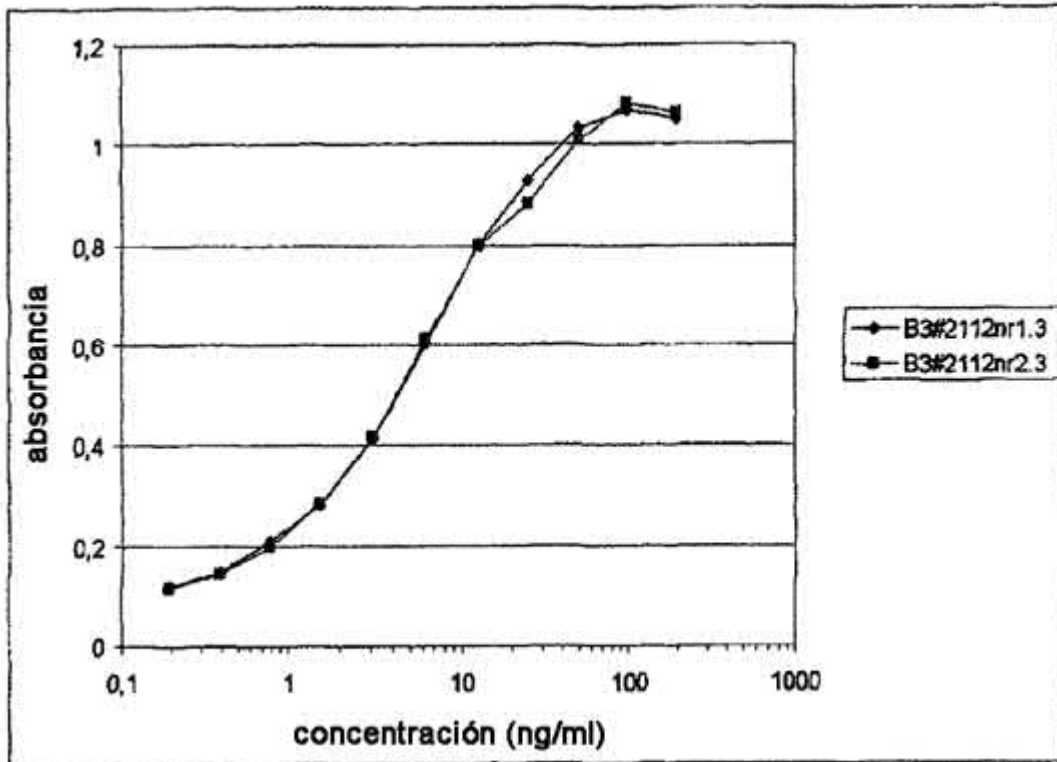


Figura 44

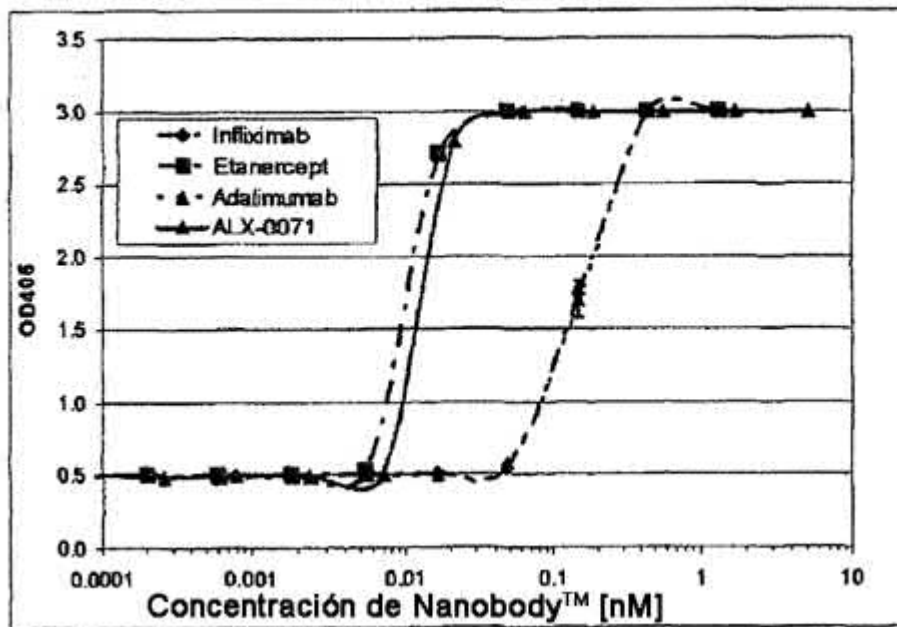


Figura 45

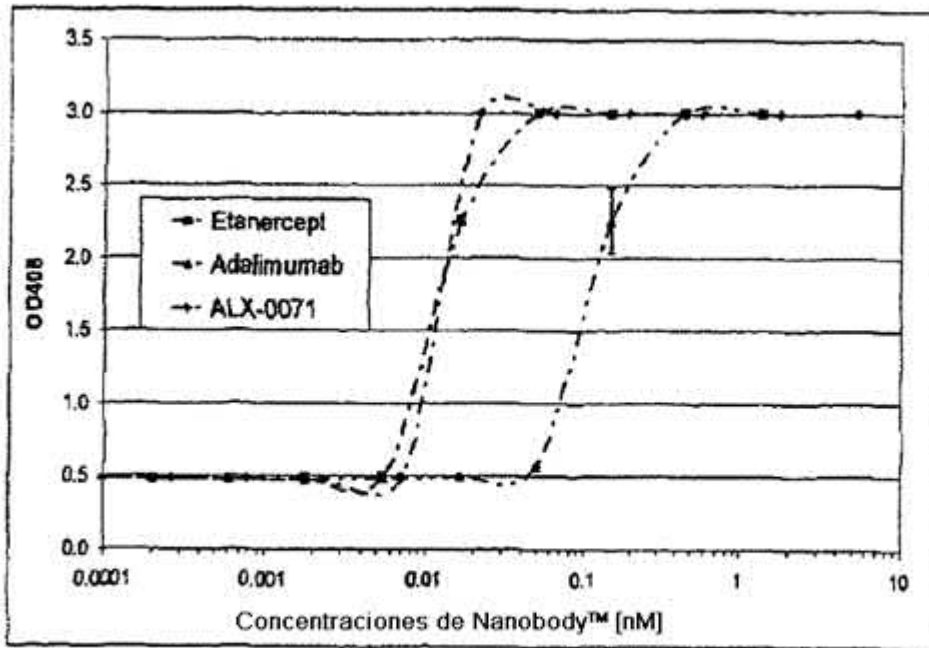


Figura 46

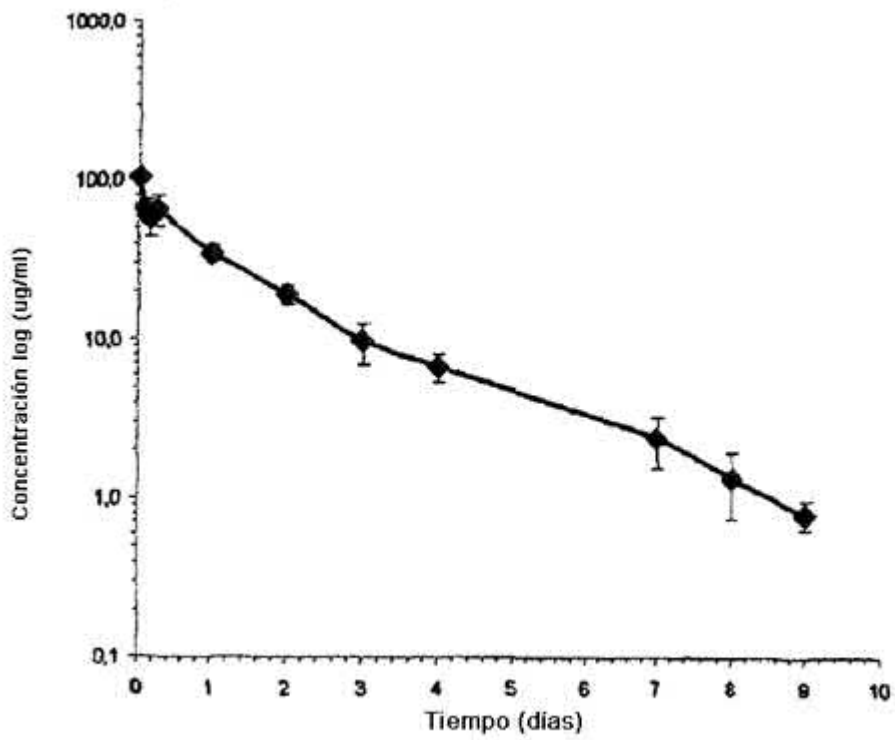


Figura 47

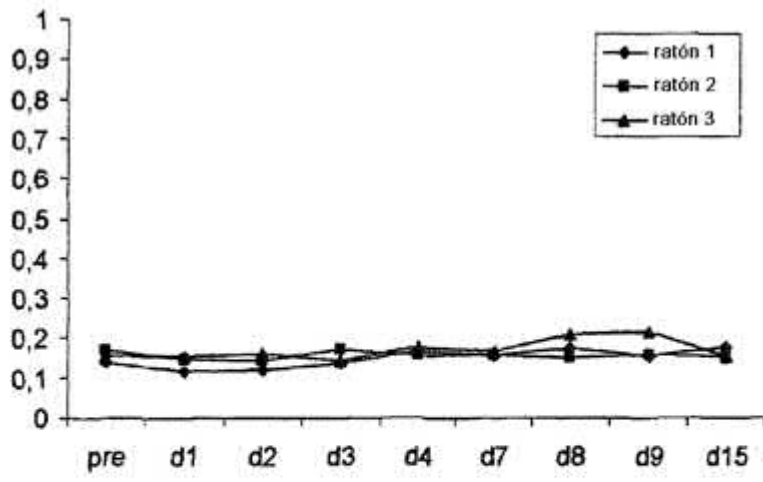


Figura 48

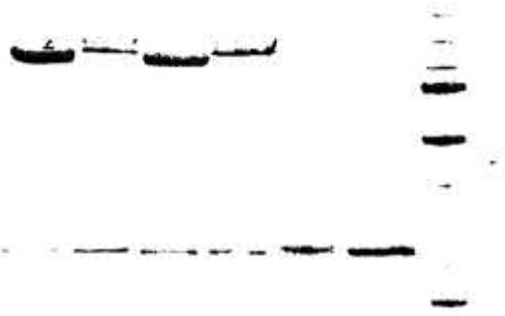


Figura 49



Figura 50



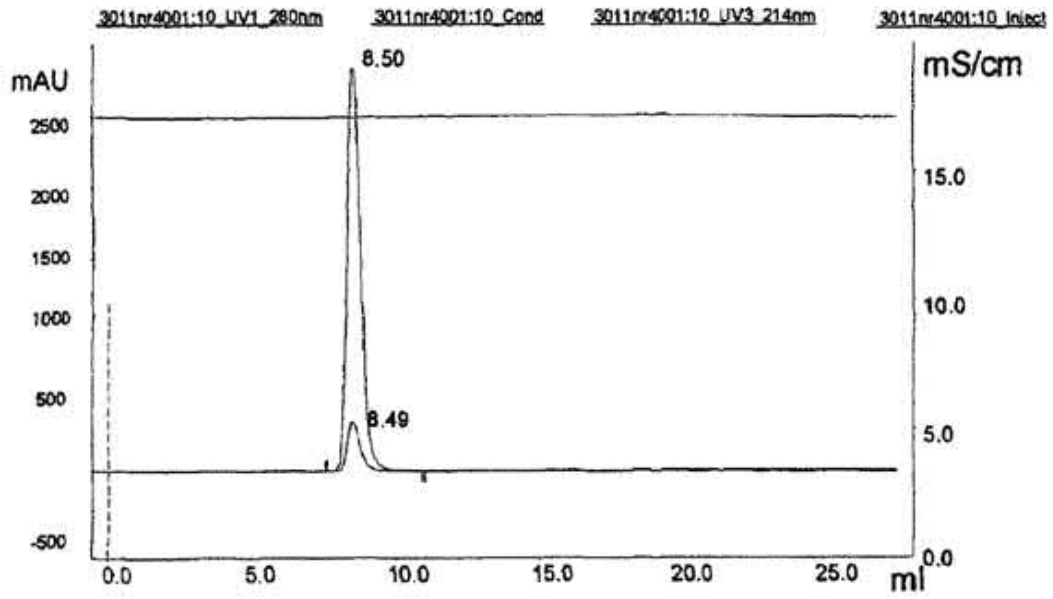


Figura 51

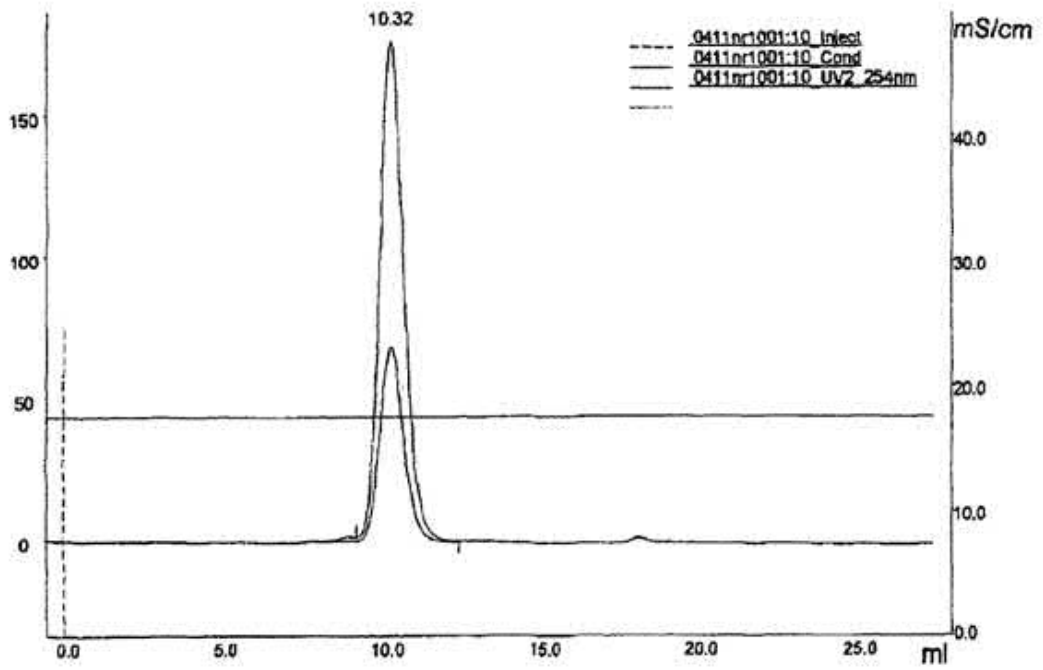


Figura 52

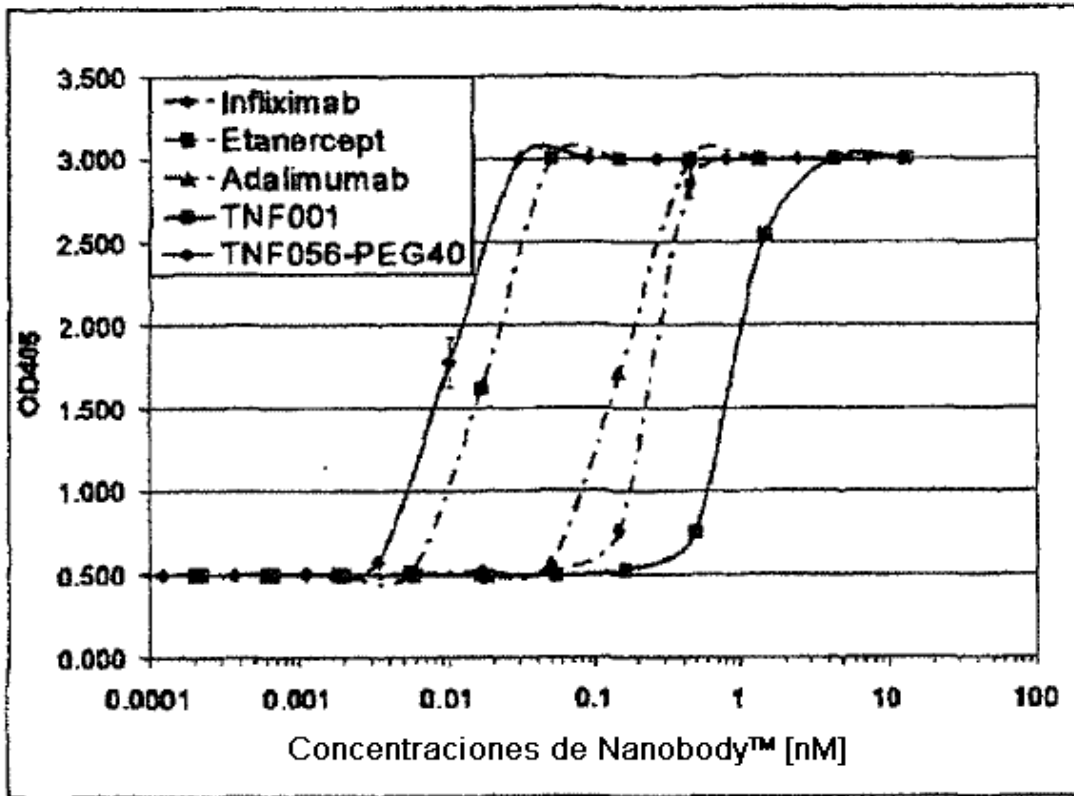


Figura 53

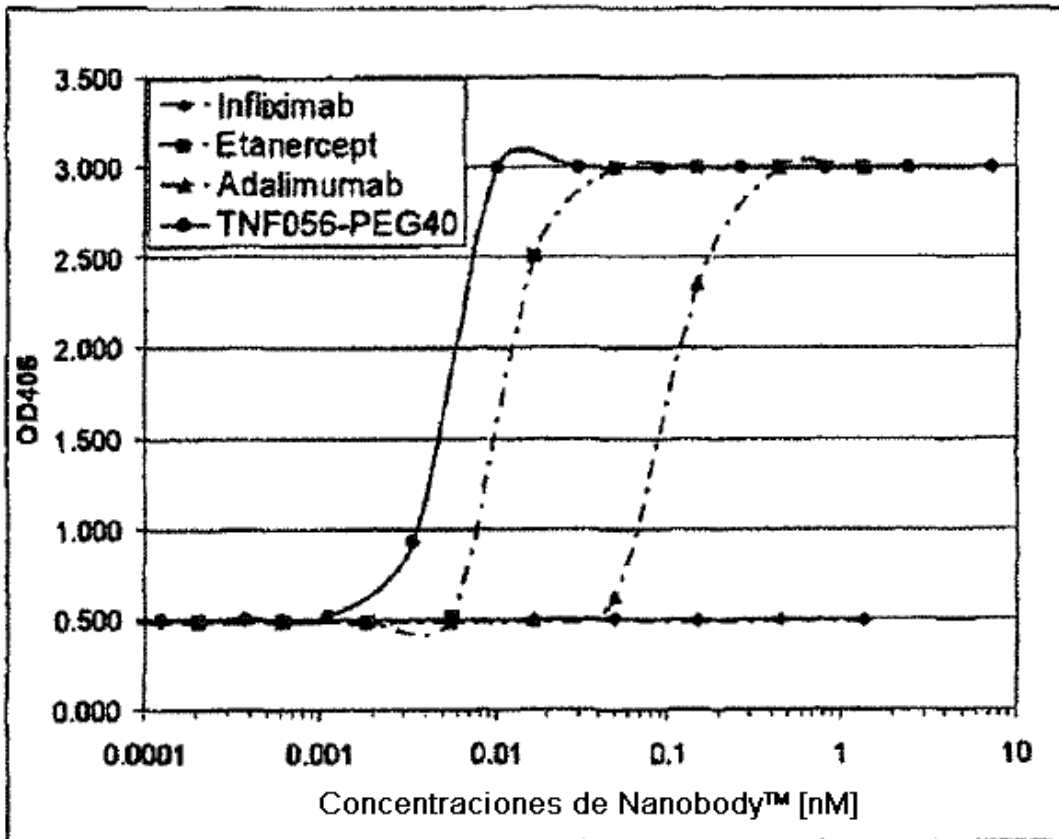


Figura 54

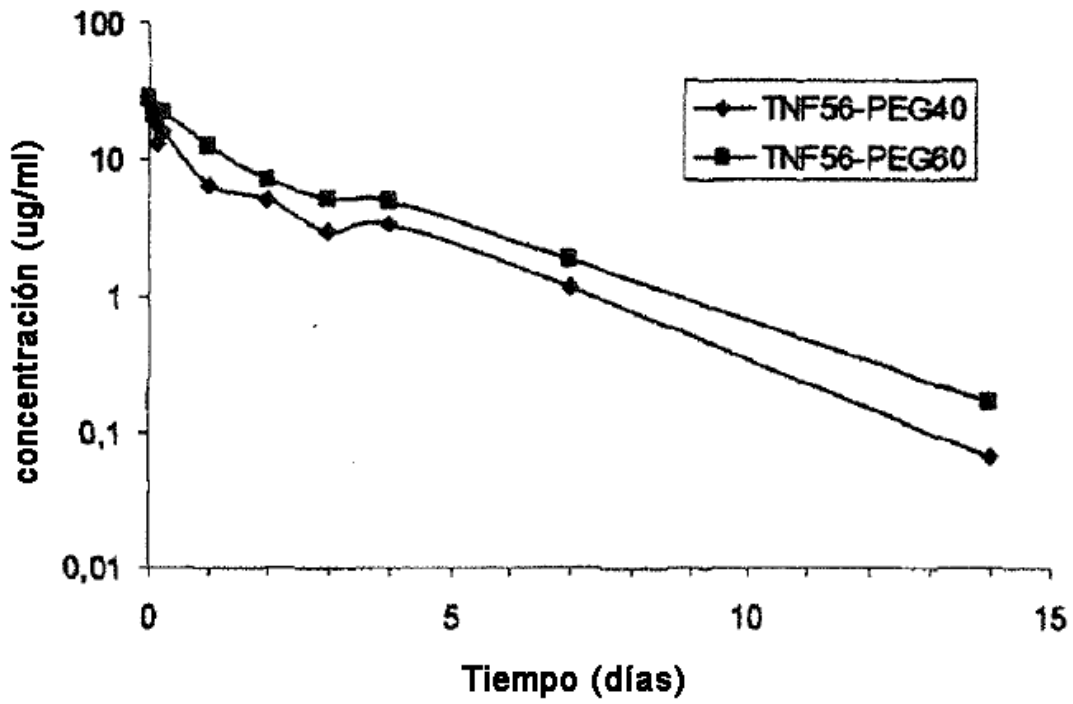


Figura 55

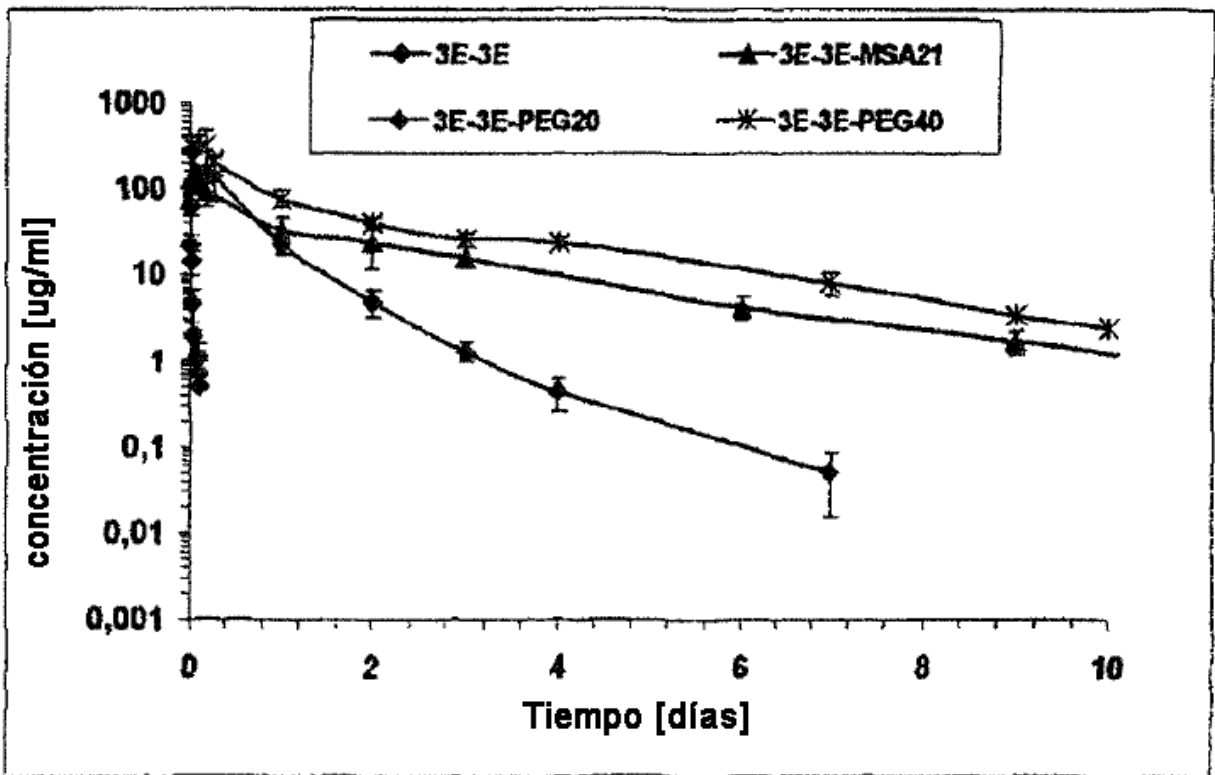


Figura 56

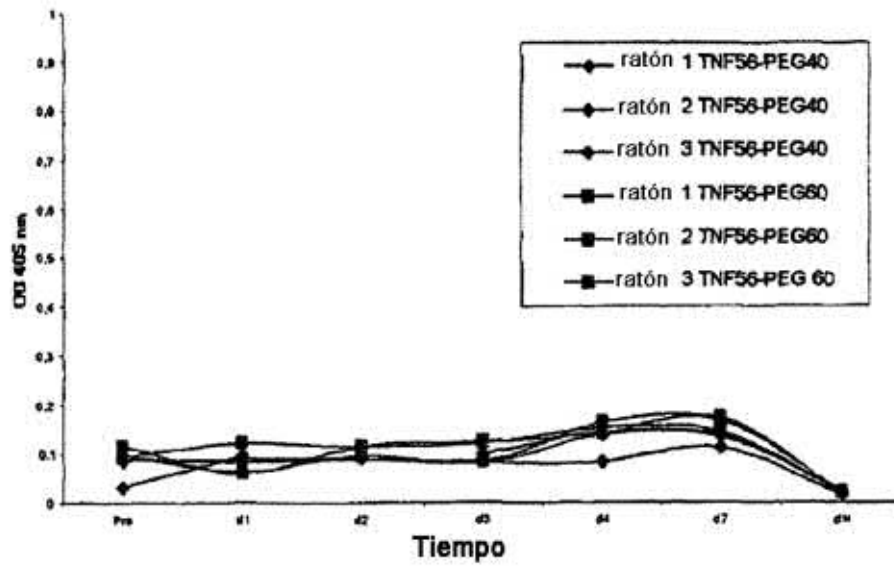


Figura 57

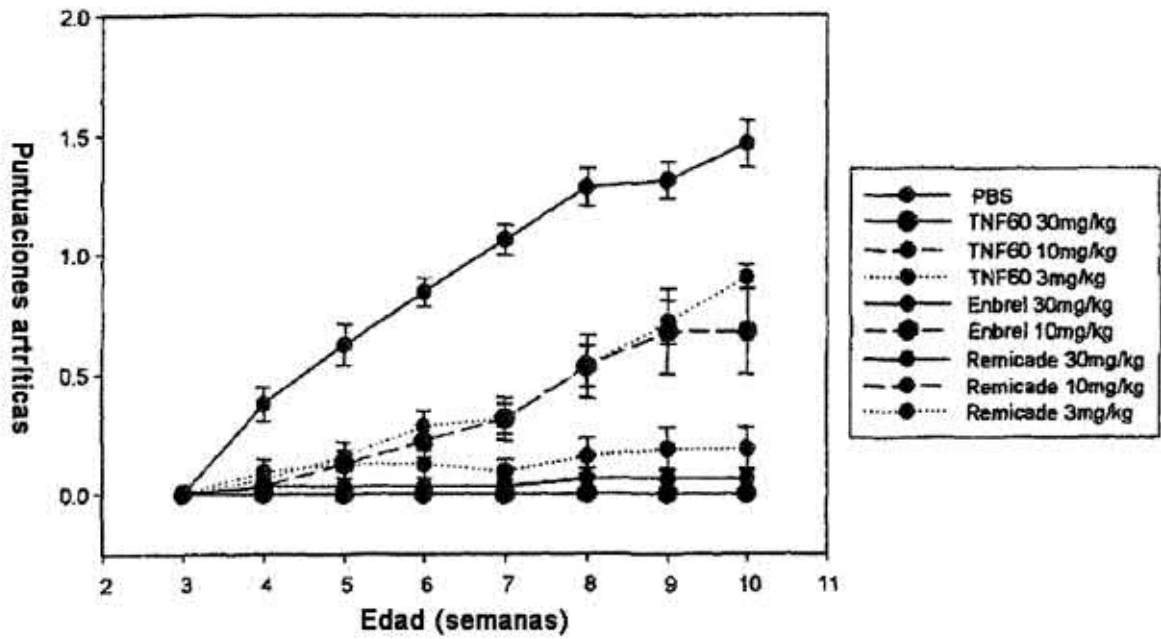


Figura 58

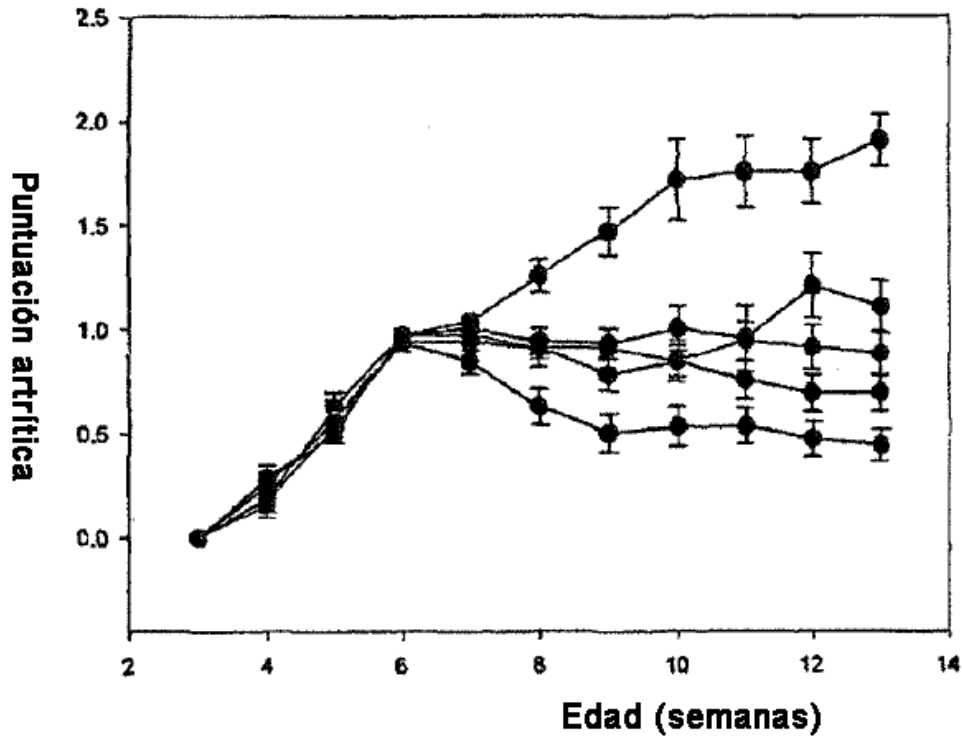


Figura 59

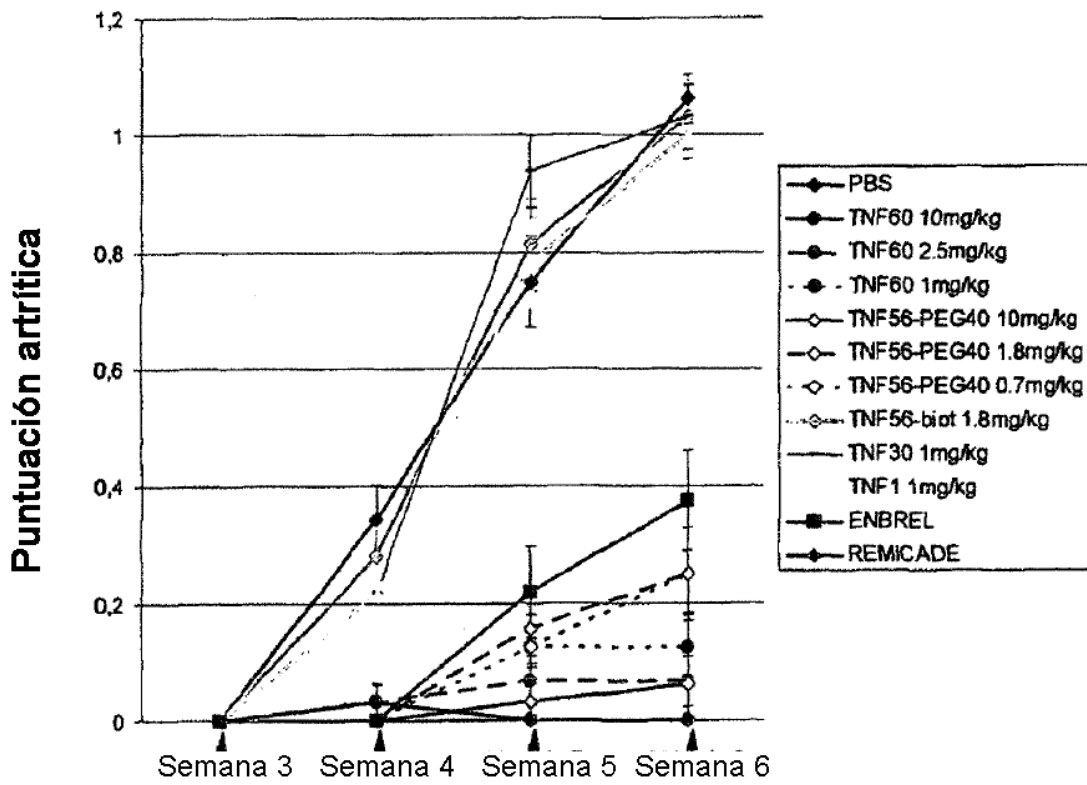


Figura 60

		1		50
PMP1C2+M13rev	(1)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRFSRYW-----YWRQAPGKGL		
VHH1A	(1)	QVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDVSVW-----YWRQAPGKGL		
VHH3E	(1)	QVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFSDHSGYTYIGWFRQAPGKER		
VHH3G	(1)	QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRFSAIS--VIGWFRQAPGKER		
Consenso	(1)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDFHW	Y	TM
		51		100
PMP1C2+M13rev	(46)	EWVSEINTNGITKYPDSVKGRFISRDAKNTLYLQMNSLKPEDTALYY		
VHH1A	(46)	EWVSEINTNGITKYVDSVKGRFISRDAKNTLYLQMDLIPEDTALYY		
VHH3E	(51)	EFVARIYWSSGNTYYDSVKGRFAISRDIAKNTVDTLTMNLEPEDTALYY		
VHH3G	(49)	EFVARIYWSSANTYYDSVKGRFISRDAKNTVDTLMLSLKPEDTALYY		
Consenso	(51)	EFVARIYWSSLNTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYY		
		101		129
PMP1C2+M13rev	(96)	CAARDGIPTSRVSSYNYWGOGTQVTVSS		
VHH1A	(96)	CAARDGIPTSRVSSYNYWGOGTQVTVSS		
VHH3E	(101)	CAARDGIPTSRVSSYNYWGOGTQVTVSS		
VHH3G	(99)	CAARDGIPTSRVSSYNYWGOGTQVTVSS		
Consenso	(101)	CARRDGIPTSRVSSYNYWGOGTQVTVSS		

Figura 61

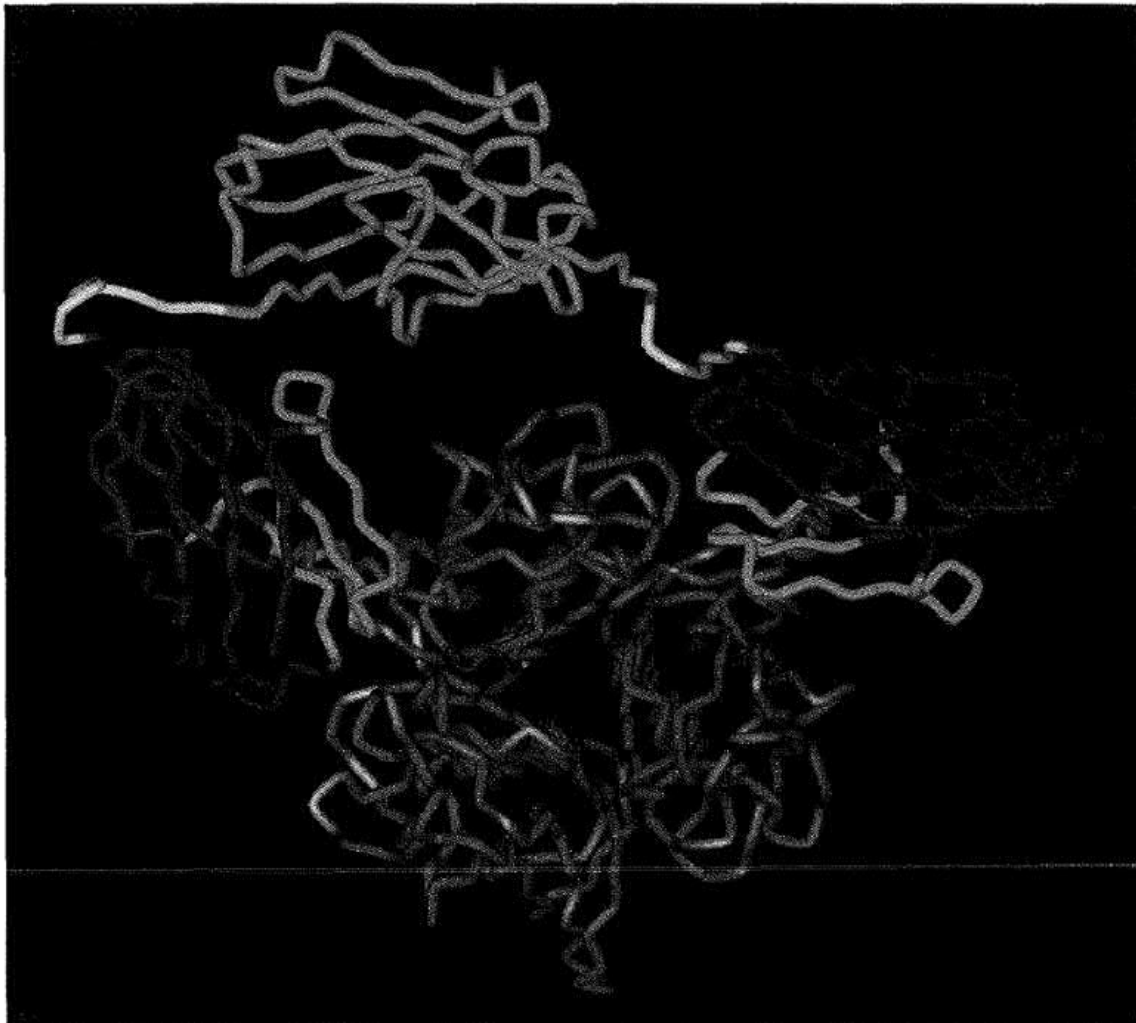


Figura 62