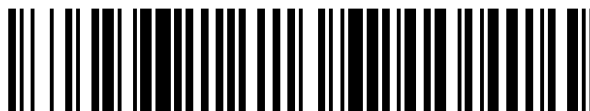


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 733**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2018** **PCT/EP2018/064665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018** **WO18220234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2018** **E 18730689 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024** **EP 3630847**

54 Título: **Inmunoglobulinas que se unen a ADAMTS**

30 Prioridad:

02.06.2017 EP 17174403

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2025

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (50.00%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE y
ABLYNX N.V. (50.00%)

72 Inventor/es:

BUYSE, MARIE-ANGE;
HERMANS, GUY;
LINDEMANN, SVEN;
GUEHRING, HANS;
GUENTHER, RALF y
KELLNER, ROLAND

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 002 733 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

Inmunoglobulinas que se unen a ADAMTS

5 Campo de la invención

1 CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a inmunoglobulinas que se unen a ADAMTS5 y, más en particular, a los polipéptidos, que comprenden o consisten esencialmente en una o más de esas inmunoglobulinas (también denominadas en el presente documento "*inmunoglobulina(s) de la invención*" y "*polipéptidos de la invención*", respectivamente). La invención también se refiere a constructos que comprenden tales inmunoglobulinas, tales como dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD, por sus siglas en inglés) o polipéptidos, así como composiciones farmacéuticas, que comprenden dichos polipéptidos. La invención se refiere además a usos de polipéptidos con fines profilácticos y/o terapéuticos, tales como los fines profilácticos y/o terapéuticos mencionados en el presente documento. Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención se aclararán a partir de la descripción adicional del presente documento. Los ejemplos divulgados en el presente documento incluyen aspectos que se utilizan para la invención, tales como los ácidos nucleicos que codifican tales inmunoglobulinas o polipéptidos; métodos para preparar tales inmunoglobulinas, polipéptidos y constructos; células hospedadoras que expresan o son capaces de expresar tales inmunoglobulinas o polipéptidos.

2 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 La osteoartritis (OA) es una de las causas más comunes de discapacidad en todo el mundo. Afecta a 30 millones de estadounidenses y es el trastorno articular más común. Se proyecta que en el 2025 estará afectada más del 20 por ciento de la población de EE. UU. La enfermedad no es sistémica y generalmente se restringe a pocas articulaciones. Sin embargo, la enfermedad puede ocurrir en todas las articulaciones, con mayor frecuencia las rodillas, las caderas, las manos, el hombro y la columna vertebral. La OA se caracteriza por la erosión progresiva del cartílago articular (cartílago que cubre los huesos) que resulta en dolor crónico y discapacidad. En última instancia, la enfermedad conduce a la destrucción total del cartílago articular, esclerosis del hueso subyacente, formación de osteofitos, etc., conduciendo todo ello a la pérdida de movimiento y dolor. La osteoartritis puede definirse como un grupo diverso de afecciones caracterizadas por una combinación de síntomas articulares, signos derivados de defectos en el cartílago articular y cambios en los tejidos adyacentes, incluidos huesos, tendones y músculos. El dolor es el síntoma más prominente de la OA y la mayoría de las veces la razón por la que los pacientes buscan ayuda médica. No hay cura para la OA, es decir, los tratamientos actuales no inhiben el deterioro estructural de la articulación con OA. El manejo de la enfermedad se limita a tratamientos que son paliativos en el mejor de los casos y hacen poco para abordar la causa subyacente de la progresión de la enfermedad. Aunque la iniciación de la enfermedad puede ser multifactorial, la destrucción del cartílago parece ser el resultado de la destrucción proteolítica descontrolada de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Los componentes de la ECM más abundantes del cartílago articular son el colágeno (colágeno II principalmente) y los proteoglucanos, principalmente agrecano (Kiani *et al.* 2002 Cell Research 12:19-32).

45 El agrecano es importante en el buen funcionamiento del cartílago articular porque proporciona una estructura de gel hidratada que dota al cartílago de propiedades de soporte de carga. El agrecano es una molécula grande, multimodular (2317 aminoácidos) expresada por los condrocitos. Su proteína central está compuesta por tres dominios globulares (G1, G2 y G3) y una gran región que se extiende entre G2 y G3 para la unión de la cadena del mucopolisacárido. Esta región extendida comprende dos dominios, uno sustituido con cadenas de sulfato de queratano (dominio KS) y otro con cadenas de sulfato de condroitina (dominio CS). El dominio CS tiene 100-150 cadenas mucopolisacáridicas (GAG, por sus siglas en inglés) unidas a él. El agrecano forma complejos grandes con hialuronano en los que 50-100 moléculas de agrecano interactúan a través del dominio G1 y conectan la proteína con una molécula de hialuronano. Al absorber agua (debido al contenido de GAG) estos complejos forman un gel reversiblemente deformable que resiste la compresión. La estructura, la retención de líquidos y la función del cartílago articular están conectados al contenido de la matriz de agrecano, y la cantidad de sulfato de condroitina unida a la proteína central intacta. Estructuralmente, la OA se caracteriza por la degradación de agrecano, donde se liberan progresivamente los dominios G3 y G2 (lo que da como resultado la 'deflación' del cartílago) y finalmente la liberación del dominio G1 y la degradación del colágeno, lo que destruye irreversiblemente la estructura del cartílago. El sitio de escisión de agrecano más significativo para la patogénesis de la OA se encuentra en la secuencia TEGE³⁷³ARGS. Este sitio de escisión está situado en el dominio interglobular (IGD, por sus siglas en inglés) de agrecano. Los anticuerpos que reconocen el neo-epitope ³⁷⁴ARGS llevaron al descubrimiento de la agrecanasa-1, que resultó ser ADAMTS4 y agrecanasa-2, que es ADAMTS5. Posteriormente, se demostró que otras enzimas ADAMTS relacionadas, incluidas ADAMTS1, -8, -9, -15 y -20, tenían actividad agrecanasa. ADAMTS16 y 18 también son agrecanasas débiles. Las ADAMTS y las metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés) comparten un sitio de unión a agrecano que es muy similar tanto en secuencia como en forma general (El Bakali *et al.*, 2014 Future Medicinal Chemistry (Review) 6:1399).

Las enzimas ADAMTS (una desintegrina A y metaloproteínasa con motivos trombospondina) son enzimas secretadas, metaloendopeptidasas de zinc asociadas a la matriz multidominio, que tienen diversas funciones en la morfogénesis tisular y remodelación fisiopatológica, en la inflamación y en la biología vascular (Kelwick *et al.* 2015 Genome Biology 16:113). La familia humana incluye 19 miembros que pueden ser subagrupados en función de sus sustratos conocidos. Las agrecanasas o proteoglucanasas incluyen ADAMTS1, -4, -5, -8, -9, -15 y -20, que pueden escindir proteínas extracelulares de tipo proteoglucano con sulfato de condroitina (CSPG, por sus siglas en inglés) que se une a hialuronano, incluidos agrecano, versicano, brevicano y neurocano. Los dos sitios de escisión más preferidos en el agrecano bovino se encuentran en KEE¹⁶⁶⁷↓¹⁶⁶⁸GLGS, seguidos de GELE¹⁴⁸⁰↓¹⁴⁸¹GRGT. Posteriormente, se produce la escisión en NITEGE³⁷³↓³⁷⁴ARGS en el IGD (en el que las MMPs no cortan), y se libera el neoepítipo mencionado anteriormente, y en TAQE¹⁷⁷¹↓¹⁷⁷²AGEG y VSQE¹⁸⁷¹↓¹⁸⁷²LGQR en la región CS-2 (Fosang *et al.* 2008 European Cells and Materials 15:11-26). Estos sitios de escisión están sumamente conservados en seres humanos, bovinos, ratones y ratas.

Varias series de indicios indican que ADAMTS5 es una enzima principal involucrada en la patogénesis de la osteoartritis. ADAMTS5 es una agrecanasa importante presente en el cartílago. En los explantes y condrocitos de cartílago humano, la atenuación génica de ADAMTS5 atenuó la descomposición del agrecano, lo que sugiere que esta enzima puede estar involucrada en los tejidos humanos. La expresión de la enzima aumenta por la acción de citocinas tales como la interleucina-1 y la oncostatina-M, que provocan la descomposición del agrecano en los tejidos. Se detectan fragmentos de agrecano generados por ADAMTS5 en el líquido sinovial y suero de pacientes con OA (Germaschewski *et al.*, 2014 Osteoarthritis Cartilage 22:690-697).

ADAMTS5 es sintetizada en primer lugar como una proteína inactiva, que incluye un dominio proteasa en el extremo N y un dominio auxiliar en el extremo C. El dominio de la proteasa consiste en un péptido señal, un prodominio con una secuencia de reconocimiento de furina y un dominio catalítico. El prodominio es escindido por las convertasas de proproteína para producir las enzimas activas. ADAMTS5 contiene además dominios auxiliares que participan activamente en el reconocimiento del sustrato y modulan la afinidad de la proteinasa por su(s) sustrato(s) ("exositios"). El dominio similar a la desintegrina, la repetición similar a trombospondina central tipo I (TS, por sus siglas en inglés), el dominio rico en cisteína, la región espaciadora y el motivo TS adicional de ADAMTS5 son dominios auxiliares con potenciales funciones de exositio. El dominio rico en cisteína parece ser esencial para la unión y el acoplamiento de ADAMTS5 a los mucopolisacáridos. La mayor variabilidad en los miembros de ADAMTS se encuentra en estos dominios auxiliares (Kelwick *et al.*, 2015 Genome Biology 16:113).

Se está realizando una intensa búsqueda para hallar fármacos antiosteoartríticos modificadores de enfermedades (DMOAD, por sus siglas en inglés), que pueden definirse como fármacos que inhiben la progresión estructural de la enfermedad e idealmente también mejoran los síntomas y/o la función. Es probable que los DMOAD se prescriban durante períodos prolongados en esta enfermedad crónica de una población que envejece, por lo tanto, exigen excelentes datos de seguridad en una población diana con múltiples comorbilidades y el potencial de interacciones fármaco-fármaco.

Varias compañías farmacéuticas han desarrollado moléculas pequeñas inhibidoras de ADAMTS5. Algunos de estos compuestos se afirman que son específicos para ADAMTS5, mientras que otros tienen efecto también contra otros miembros ADAMTS, o incluso contra MMP. Se considera que estas inhibiciones cruzadas son responsables del síndrome musculoesquelético, un efecto secundario causado por inhibidores de amplio espectro que conlleva artralgia, mialgia, rigidez articular y tendinitis (Santamaria *et al.*, 2015 Biochem J 471:391-401). El inhibidor de la agrecanasa de Wyeth AGG-523 se utilizó en 5 ensayos clínicos de fase I en sujetos sanos y pacientes con OA, pero no se ha continuado con su estudio. Tampoco las otras moléculas pequeñas inhibidoras de ADAMTS han entrado en ningún desarrollo clínico adicional como posible DMOAD (Bondeson *et al.*, 2015 Drug Discovery 10:5-14). De hecho, a pesar de una serie de ensayos clínicos recientes que investigan específicamente los DMOAD, hasta ahora no se han aprobado tales tratamientos (El Bakali *et al.*, 2014 Future Medicinal Chemistry (Review) 6:1399).

En vista del éxito de la terapia biológica dirigida con anticuerpos ("Ab"), hubo interés en desarrollar estrategias terapéuticas similares para la OA. Un estudio del anticuerpo monoclonal de Rottapharm (mAb) CRB0017, dirigido contra el dominio espaciador de ADAMTS5, mostró que en ratones, la administración intraarticular de este mAb previene significativamente la progresión de la enfermedad de manera dependiente de la dosis (Chiusaroli *et al.*, 2013 Osteoarthritis Cartilage 21:1807). No hubo comparación con la administración sistémica, ni se evaluó en qué grado el mAb se filtró del espacio sinovial. Otro estudio utilizó la administración sistémica del mAb 12F4 en ratones, que demostró tanto la modificación estructural de la enfermedad como el alivio del comportamiento relacionado con el dolor (Miller *et al.*, 2014 Osteoarthritis Cartilage 22iii, S35). Sin embargo, una sola administración del mAb 12F4 en mono cangrejero causó hemorragia focal, un aumento de la presión arterial media dependiente de la dosis y anomalías de conductancia cardíaca (más específicamente, elevaciones de ST y arritmias ventriculares en el ECG) que indicaban isquemia cardíaca, que se mantuvieron hasta 8 meses después de la administración de la dosis única (Larkin *et al.*, 2014 Osteoarthritis Cartilage 22iii, S483). Estos efectos secundarios detuvieron el desarrollo clínico adicional del mAb 12F4.

El documento WO2008/074840 en el nombre de Ablynx NV describe la generación de Nanobodies® contra miembros de la familia de la desintegrina A y metaloproteinasas (ADAM), incluida ADAMTS5.

El documento WO2011/002968 en el nombre de Glaxo Group LTD divulga un panel de anticuerpos inhibitorios contra ADAMTS5.

Las intervenciones terapéuticas en las articulaciones se han visto obstaculizadas aún más por la dificultad de dirigir los fármacos al cartílago articular. Debido a que el cartílago articular es un tejido avascular y alféptico, las rutas tradicionales de suministro de fármacos (oral, intravenosa, intramuscular) en última instancia dependen de la transferencia transsinovial de fármacos de los capilares sinoviales al cartílago por difusión pasiva. Esto provocó el desarrollo del suministro intraarticular (IA) de medicamentos.

Por otro lado, el suministro de IA de proteínas terapéuticas se ha visto limitado por su rápida eliminación del espacio articular y la falta de retención dentro del cartílago; y la restricción a las articulaciones grandes. El tiempo de residencia sinovial de un fármaco en la articulación suele ser inferior a 24 h (Edwards 2011 Vet J 190:15-21; Larsen *et al.*, 2008 J Pharm Sci 97:4622-4654). Debido a la rápida eliminación de la mayoría de los fármacos inyectados por vía IA, se necesitarían inyecciones frecuentes para mantener una concentración eficaz (Owen *et al.*, 1994 Br J Clin Pharmacol 38:349-355).

Además, la administración IA de proteínas terapéuticas no es factible desde un punto de vista práctico para las articulaciones pequeñas, lo que dificulta el tratamiento de, p. ej., los dedos con OA.

Sigue siendo necesario contar con un DMOAD eficaz.

3 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objetivo proporcionar polipéptidos contra OA con mejores propiedades profilácticas, terapéuticas y/o farmacológicas, además de otras propiedades ventajosas (tales como, por ejemplo, una mayor facilidad de preparación, una buena estabilidad y/o una reducción de los costes de los bienes), en comparación con las secuencias de aminoácidos y anticuerpos de la técnica anterior. En particular, la presente invención tiene como objetivo proporcionar polipéptidos que inhiben ADAMTS5. Toda referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Los ADAM, ADAMTS y MMP comparten un sitio de unión a agregano que es muy similar tanto en secuencia como en forma general. Dado que los otros miembros de la familia ADAM (incluido TACE) y ADAMTS tienen diversas funciones en la fisiología normal están fuertemente asociados con muchas afecciones patológicas comunes, que incluyen asma, artritis, cáncer, trastornos del tejido conectivo o púrpura trombocitopénica trombótica (El Bakali *et al.*, *supra*), los inventores apreciaron la importancia de preservar la selectividad. Con el fin de silenciar eficazmente solo la actividad de ADAMTS5, elegir como diana el dominio catalítico parecía ser la mejor opción. Sin embargo, los dominios catalíticos de ADAMTS4 y ADAMTS5 comparten un alto grado de similitud de secuencia (véase El Bakali *et al.*, *supra*). Además, resultó que la elevada conservación de secuencia del dominio catalítico entre varias especies evita una respuesta inmunitaria robusta.

Sorprendentemente, los ISVD de la invención tal como se definen en las reivindicaciones cumplieron estos dos requisitos aparentemente excluyentes entre sí de inhibir la actividad (enzimática) de ADAMTS5 por un lado, mientras que preservaban la selectividad por el otro.

Varios ISVD monovalentes de la presente invención fueron equipotentes al anticuerpo bivalente convencional mAb 12F4 H4L0 en un ensayo enzimático AlphaLISA. Además de esto, los ISVD de la presente invención también fueron equipotentes al anticuerpo bivalente convencional mAb12F4 H4L0 a una concentración de sustrato agregano alta o incluso excesiva, que recuerda a las articulaciones. Por otro lado, en un ensayo de explante bovino *ex vivo*, que se asemeja aún más a las condiciones fisiológicas, la mayoría de los ISVD monovalentes tuvieron una mejor CI₅₀ que el mAb 12F4 H4L0 ("12F4") y el mAb CRB0017 de Rottapharm de comparación. En un ensayo de explante humano *ex vivo*, los ISVD de la presente invención también fueron sustancialmente mejores que el anticuerpo convencional CRB0017 de la técnica anterior, como lo demuestra la CI₅₀.

Después de diseñar adicionalmente los ISVD teniendo en cuenta varias características diversas y favorables, incluidas la estabilidad, afinidad y actividad inhibidora, así como la reducción al mínimo de la inmunogenicidad, estos ISVD fueron evaluados a continuación *in vivo*.

La administración sistémica de los ISVD de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, demostró una potente inhibición de la actividad de la agreganasa *in vivo*, evaluada en el mono cangrejero. Además, los ISVD también fueron seguros de usar, a diferencia del anticuerpo de la técnica anterior 12F4. También en un

modelo *in vivo* de desestabilización del menisco interno (DMM) de ratón, los ISVD de la presente invención mostraron un beneficio estructural de hasta un 50 % tanto para el tratamiento profiláctico como terapéutico por administración sistémica. El tratamiento precoz con los ISVD de la presente invención causó un beneficio sintomático significativo y valioso dependiente de la dosis durante el corte transversal del ligamento cruzado anterior y la resección del menisco interno (ACLT + tMx, por sus siglas en inglés) con OA inducida en ratas.

Los ISVD están destinados en última instancia a inhibir ADAMTS5 en las articulaciones y por lo tanto deberán resistir las condiciones del líquido sinovial en las articulaciones, que contiene varias proteasas. Junto a las características favorables anteriores, se demostró que los ISVD aislados eran extremadamente estables en líquido sinovial. Se prevé que esta estabilidad permita una pauta posológica menos frecuente.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos 1 dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que une una desintegrina A y metaloproteínasa con motivo trombospondina 5 (ADAMTS5), en donde dicho ISVD que se une a ADAMTS5 comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (de CDR1 a CDR3, respectivamente) y 4 regiones armazón (de FR1 a FR4, respectivamente), en las cuales CDR1 es la SEQ ID NO: 21, CDR2 es la SEQ ID NO: 37 y CDR3 es la SEQ ID NO: 55, y en las cuales (i) FR1 es la SEQ ID NO: 72, FR2 es la SEQ ID NO: 86, FR3 es la SEQ ID NO: 96 y FR4 es la SEQ ID NO: 114, o (ii) FR1 tiene la secuencia de aminoácidos DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS, FR2 es la SEQ ID NO: 88, FR3 tiene la secuencia de aminoácidos YVDSLKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAA, y FR4 es la SEQ ID NO: 114. En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica, en donde dicho ISVD que se une a ADAMTS5 no se une a ADAMTS4, MMP1 o MMP14.

En las realizaciones preferidas de todos los aspectos de la invención, un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) de acuerdo con la invención consiste preferentemente o consiste esencialmente en 4 regiones armazón (de FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 como se describe en el presente documento anteriormente y más adelante. Las secuencias armazón preferidas se divulgan, por ejemplo, en la Tabla A-2 más adelante y se pueden utilizar en un ISVD de la invención. Preferentemente, los CDR representados en la Tabla A-2 se corresponden con las respectivas regiones armazón del mismo constructo ISVD.

La invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en el que CDR1 es la SEQ ID NO: 21, CDR2 es la SEQ ID NO: 37 y CDR3 es la SEQ ID NO: 55.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en el que dicho ISVD es la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido se une a ADAMTS5 con una K_D entre $1E^{-07}$ M y $1E^{-13}$ M, tal como entre $1E^{-08}$ M y $1E^{-12}$ M, preferentemente como máximo $1E^{-07}$ M, preferentemente más baja que $1E^{-08}$ M o $1E^{-09}$ M, o incluso más baja que $1E^{-10}$ M, tal como $5E^{-11}$ M, $4E^{-11}$ M, $3E^{-11}$ M, $2E^{-11}$ M, $1,7E^{-11}$ M, $1E^{-11}$ M, o incluso $5E^{-12}$ M, $4E^{-12}$ M, $3E^{-12}$ M, $1E^{-12}$ M, por ejemplo, determinada por KinExA, o como alternativa por Gyrolab.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido inhibe una actividad de ADAMTS5 con una CI_{50} de entre $1E^{-07}$ M y $1E^{-12}$ M, tal como entre $1E^{-08}$ M y $1E^{-11}$ M, por ejemplo, según se determina mediante el ensayo FRET humano o AlphaLISA humano.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido inhibe una actividad (enzimática) de ADAMTS5 con una CI_{50} de como máximo $1E^{-07}$ M, preferentemente $1E^{-08}$ M, $5E^{-09}$ M, o $4E^{-9}$ M, $3E^{-9}$ M, $2E^{-9}$ M, tal como $1E^{-9}$ M.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido modula ADAMTS5 con una CE_{50} de entre $1E^{-07}$ M y $1E^{-12}$ M, tal como entre $1E^{-08}$ M y $1E^{-11}$ M, por ejemplo, según se determina mediante ELISA de unión.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido se une a ADAMTS5 con una velocidad de disociación inferior a $1E^{-04}$ s⁻¹, por ejemplo, según se determina mediante SPR.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho ADAMTS5 es ADAMTS5 humano (SEQ ID NO: 149), ADAMTS5 bovino (SEQ ID NO: 150), ADAMTS5 de rata (SEQ ID NO: 151), ADAMTS5 de cobaya (SEQ ID NO: 152), ADAMTS5 de ratón (SEQ ID NO: 153) o ADAMTS5 de mono cangrejero (SEQ ID NO: 154), preferentemente ADAMTS5 humana, de la manera más preferente la SEQ ID NO: 149.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido ejerce un efecto antagonista respecto a la actividad de ADAMTS5, tal como una actividad proteasa, tal como la escisión de agregano, versicano, brevicano, neurocano, decorina, y/o biglicano,

preferentemente escisión de agrecano; preferentemente ejerce un efecto antagonista respecto a la actividad agrecanasa de ADAMTS5.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido ejerce un bloque en la unión de ADAMTS5 a agrecano de al menos un 20 %, tal como, al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso más, por ejemplo, determinado por FRET, AlphaLISA o ELISA.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido inhibe la actividad proteasa de ADAMTS5, por ejemplo, inhibe la proteólisis de un sustrato, tal como agrecano, versicano, brevicano, neurocano, decorina, y/o biglicano, preferentemente agrecano.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende al menos 2 ISVD, en donde al menos 1 ISVD se une específicamente a ADAMTS5, preferentemente la SEQ ID NO: 2, preferentemente en donde dichos al menos 2 ISVD se unen específicamente a ADAMTS, preferentemente ADAMTS5.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica que comprende dos o más ISVD que se unen específicamente a ADAMTS5, en donde (a) al menos un "primer" ISVD se une específicamente a un primer determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o conformación de ADAMTS5; y en donde (b) al menos un "segundo" ISVD se une específicamente a un segundo determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o conformación de ADAMTS5, diferente del primer determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o conformación, respectivamente, preferentemente en donde dicho "primer" ISVD que se une específicamente a ADAMTS5 es la SEQ ID NO: 2, preferentemente en donde dicho "segundo" ISVD que se une específicamente a ADAMTS5 es la SEQ ID NO: 118 o 19, incluso más preferentemente dicho polipéptido se elige del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 127 (clon 130 049-093-Alb), SEQ ID NO: 126 (clon 129 2F3-093-Alb), SEQ ID NO: 127 (clon 130 049-093-Alb) y SEQ ID NO: 128 (clon 131 9D3-093-Alb).

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que además comprende un ISVD que se une a albúmina sérica, preferentemente en donde dicho ISVD que se une a albúmina sérica consiste esencialmente en 4 regiones armazón (de FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (de CDR1 a CDR3, respectivamente), en las cuales CDR1 es la SEQ ID NO: 146, CDR2 es la SEQ ID NO: 147, y CDR3 es la SEQ ID NO: 148, incluso más preferentemente en donde dicho ISVD que se une a albúmina sérica se elige del grupo que consiste en ALB8 (SEQ ID NO: 131), ALB23 (SEQ ID NO: 132), ALB129 (SEQ ID NO: 133), ALB132 (SEQ ID NO: 134), ALB11 (SEQ ID NO: 135), ALB11 (S112K)-A (SEQ ID NO: 136), ALB82 (SEQ ID NO: 137), ALB82-A (SEQ ID NO: 138), ALB82-AA (SEQ ID NO: 139), ALB82-AAA (SEQ ID NO: 140), ALB82-G (SEQ ID NO: 141), ALB82-GG (SEQ ID NO: 142), ALB82-GGG (SEQ ID NO: 143), ALB92 (SEQ ID NO: 144) y ALB223 (SEQ ID NO: 145), aún más preferentemente en donde dicho polipéptido se elige del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 129 (clon 577 2F3^{SO}-Alb), SEQ ID NO: 130 (clon 579 2F3^{SO}-093-Alb), SEQ ID NO: 120 (clon 4 2A12-Alb), SEQ ID NO: 121 (clon 5 2D7-Alb), SEQ ID NO: 122 (clon 6 2F3-Alb), SEQ ID NO: 123 (clon 69 049-Alb), SEQ ID NO: 124 (clon 70 9D3-Alb), SEQ ID NO: 125 (clon 71 3B2-Alb), SEQ ID NO: 126 (clon 129 2F3-093-Alb), SEQ ID NO: 127 (clon 130 049-093-Alb) y SEQ ID NO: 128 (clon 131 9D3-093-Alb).

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que además comprende al menos un ISVD que se une específicamente a agrecano, preferentemente elegido del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 156 (Nanobody 00745 PEA114F08) y la SEQ ID NO: 157 (Nanobody 00747 PEA604F02).

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende además al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano, en donde dichos al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano pueden ser iguales o diferentes, preferentemente en donde dichos al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano son elegidos independientemente del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 156 y 157, incluso más preferentemente en donde dicho ISVD que se une específicamente a agrecano, se une específicamente a agrecano humano [SEQ ID NO: 155]. Preferentemente, dicho ISVD que se une específicamente a agrecano, se une específicamente a agrecano de perro (véase también la Tabla 2), agrecano bovino, agrecano de rata; agrecano de cerdo; agrecano de ratón, agrecano de conejo; agrecano de macaco cangrejero y/o agrecano de macaco de la India. Preferentemente, dicho ISVD que se une específicamente a agrecano se une preferentemente al tejido cartilaginoso tal como el cartilago y/o menisco.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, donde dicho polipéptido tiene una estabilidad de al menos 7 días, tal como 14 días, 21 días, 1 mes, 2 meses o incluso 3 meses en líquido sinovial (SF, por sus siglas en inglés) a 37 °C.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dichos al menos dos ISVD se conectan directamente entre sí o se conectan a través de un conector,

preferentemente dicho conector se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 158 a 174 (es decir SEQ ID NO: 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173 y 174), preferentemente la SEQ ID NO: 169.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende además una extensión C-terminal, preferentemente en donde dicha extensión C-terminal es una extensión C-terminal (X)_n, en la que n es de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferentemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo aminoácido (preferentemente de origen natural) que se elige de manera independiente, y preferentemente se elige de manera independiente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I).

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de un 100 % con cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 122, 126, o 129 o 130.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, para su uso como medicamento.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, para su uso en el tratamiento o prevención de un síntoma de una enfermedad asociada a ADAMTS5, tal como, p. ej., artropatías y condrodistrofias, enfermedad artrítica, tal como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis psoriásica, rotura o desprendimiento traumáticos, acondroplasia, costocondritis, displasia espondiloepimetáfisaria, hernia de disco vertebral, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones, y policondritis recurrente, osteocondritis disecante y agrecanopatías. Más preferentemente, dicha enfermedad es una enfermedad artrítica y de la manera más preferente osteoartritis.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 de al menos uno de los polipéptidos representados por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18, y/o experimenta un bloqueo de manera cruzada de su unión a ADAMTS5 por parte de al menos un polipéptido representado por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18.

En otro aspecto preferido, la invención se refiere a un polipéptido que bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 de un polipéptido representado por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18, y/o experimenta un bloqueo cruzado de su unión a ADAMTS5 por parte de al menos un polipéptido representado por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18, en donde dicho polipéptido comprende al menos un VH, VL, dAb, dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que se une específicamente a ADAMTS5, en donde la unión a ADAMTS5 modula una actividad de ADAMTS5.

Otros aspectos, ventajas, aplicaciones y usos de los polipéptidos y las composiciones quedarán claros a partir de la divulgación adicional del presente documento. Varios documentos se citan a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

4 LEYENDAS DE FIGURAS

Figura 1:

Los ISVD que se unen a ADAMTS5 no inhiben la actividad MMP1 (A) o MMP14 (B).

Figura 2:

Los ISVD que se unen a ADAMTS5 no inhiben la actividad ADAMTS4.

Figura 3:

Niveles preexistentes de anticuerpo (preAb) que se unen al constructo Nanobody 581 (A) y al constructo Nanobody 579 (B) de 3 conjuntos de muestras de donantes procedentes de: sujetos sanos, sujetos con osteoartritis y donantes con preAb de unión residuales.

Figura 4:

El constructo Nanobody 581 ("C011400581") no se une a ADAMTS1 humana (A), y no se une a ADAMTS4 humana o ADAMTS15 humana (B).

Figura 5:

Potencia en el sistema de explante humano. Se muestra la acumulación de GAG en el sobrenadante después de 7 días.

Figura 6:

1. A) Curso temporal de liberación de GAG en el sobrenadante en el sistema de cocultivo bovino.
2. B) Cálculo del área bajo la curva (ABC) de la liberación de GAG en el tiempo (7-28 días). Número de réplicas n=4. Los datos se muestran en formato de cajas y bigotes con mín a máx.
3. C) Los datos muestran el contenido de GAG [ng/mg de cartílago] después de la digestión con papaína. Número de réplicas n=4. Los datos se muestran en formato de cajas y bigotes con mín a máx.

Figura 7:

Cálculo del área bajo la curva (ABC) de la liberación de exAGNx1 en el tiempo (7-28 días). Número de réplicas n=4. Los datos se muestran en formato de cajas y bigotes con mín a máx.

Figura 8:

Cálculo del área bajo la curva (ABC) de la liberación de C2M en el tiempo (7-28 días). Número de réplicas n=4. Los datos se muestran en formato de cajas y bigotes con mín a máx.

Figura 9:

Cálculo del área bajo la curva (ABC) de la liberación de C3M en el tiempo (7-28 días). Número de réplicas n=4. Los datos se muestran en formato de cajas y bigotes con mín a máx.

Figura 10:

Inhibición de la actividad agrecanasa en NHP.

Figura 11:

Inhibición de la degeneración del cartílago. Se muestra la mediana de la suma de la degeneración del cartílago en el tratamiento profiláctico (A) y terapéutico (B) en un modelo de DMM en ratón.

Figura 12:

Comportamiento sintomático en un modelo quirúrgico de OA en rata.

Figura 13:

Ancho de degeneración del cartílago interno de la tibia.

Figura 14:

El efecto del nanobody anti-ADAMTS-5 sobre la degradación de agrecano debida a la agrecanasa en cultivos *ex vivo* de cartílago (A, B, C) y cocultivos de cartílago y membrana sinovial (D, E). Las concentraciones enumeradas son la concentración del nanobody. El análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional o ANOVA bidireccional ordinarios. Se consideró la significancia estadística, cuando $p < 0,05$.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Sigue siendo necesario disponer de medicamentos seguros y eficaces para la OA, en particular DMOAD. Estos medicamentos deben cumplir con requisitos diversos y con frecuencia opuestos, especialmente cuando se pretende un formato de aplicación amplia. Como tal, el formato debería ser preferentemente útil en una amplia gama de pacientes. El formato debe ser preferentemente seguro y no inducir infecciones debido a la administración frecuente. Además, el formato debe preferentemente resultar cómodo para el paciente, tal como, que el formato deba permitir una pauta posológica y una vía de administración convenientes, p. ej., la administración sistémica.

Por ejemplo, se prefiere que el formato no se elimine instantáneamente de la circulación en el momento de la administración. Sin embargo, la prolongación de la semivida preferentemente no debe introducir actividad inespecífica y efectos secundarios o limitar la eficacia.

5 La presente invención cumple al menos uno de estos requisitos.

Basándose en el cribado, caracterización y estrategias combinatorias no convencionales, los presentes inventores observaron sorprendentemente que los dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) se comportaban excepcionalmente bien en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

10 Además, los presentes inventores pudieron rediseñar los ISVD y superar aún más a los fármacos de comparación en la mejora de la OA. Además, también se demostró que los ISVD de la invención eran significativamente más seguros que los compuestos de la técnica anterior.

15 La presente invención pretende proporcionar polipéptidos que ejercen un efecto antagonista respecto a ADAMTS, en particular ADAMTS5, con mejores propiedades profilácticas, terapéuticas y/o farmacológicas, incluido un perfil más seguro, en comparación con las secuencias de aminoácidos y anticuerpos de la técnica anterior.

20 En consecuencia, la presente invención se refiere a ISVD y polipéptidos que están dirigidos contra/y o que pueden unirse específicamente (como se define en el presente documento) a ADAMTS5.

25 En consecuencia, la presente invención se refiere a ISVD y polipéptidos que están dirigidos contra/y o que pueden unirse específicamente (según se define en el presente documento) a ADAMTS5 y modular su actividad, en particular un polipéptido que comprende al menos un ISVD que se une específicamente a ADAMTS5, en donde la unión a ADAMTS5 modula una actividad de ADAMTS5.

30 Salvo que indique o defina de otro modo, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, y este estará claro para los expertos en la técnica. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.^a Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), F. Ausubel *et al.* (Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York, 1987), Lewin (Genes II, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1985), Old *et al.* (Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2.^a edición) University of California Press, Berkeley, CA, 1981); Roitt *et al.* (Immunology (6.^a Ed.) Mosby/Elsevier, Edimburgo, 2001), Roitt *et al.* (Roitt's Essential Immunology (10.^a Ed.) Blackwell Publishing, Reino Unido, 2001), y Janeway *et al.* (Immunobiology (6.^a Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York, 2005), así como a la técnica anterior general citada en el presente documento.

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

50 Cabe señalar que, tal como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de dichos diferentes reactivos y la referencia a "el método" incluye la referencia a pasos y métodos equivalentes conocidos por los expertos ordinarios en la técnica que podrían utilizarse para modificar o con los que sustituir los métodos descritos en el presente documento.

55 A menos que se indique otra cosa, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a todos los elementos de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente la experimentación habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por la presente invención.

60 El término "y/o" donde se utilice en el presente documento incluye el significado de "y", "o" y "todas o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

65 El término "alrededor de" o "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a dentro del 20 %, preferentemente dentro del 15 %, más preferentemente dentro del 10 %, y de la manera más preferente dentro del 5 % de un valor o intervalo dado.

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende", se entenderá que denotan la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros o pasos indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos. Cuando se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" puede ser sustituido por el término "que contiene" o "que incluye" o, a veces, cuando se utiliza en el presente documento, por el término "que tiene".

El término "secuencia" tal como se utiliza en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulinas", "secuencia de anticuerpos", "secuencia de dominio variable", "secuencia V_{HH}" o "secuencia de proteínas"), debe entenderse de manera general que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante como los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que la codifican, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Las secuencias de aminoácidos se interpretan como un solo aminoácido o una secuencia no ramificada de dos o más aminoácidos, dependiendo del contexto. Las secuencias de nucleótidos se interpretan como una secuencia no ramificada de 3 o más nucleótidos.

Los aminoácidos son aquellos L-aminoácidos que se encuentran habitualmente en las proteínas de origen natural. Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el código estándar de aminoácidos de tres letras o una letra. Por ejemplo, se hace referencia a la Tabla A-2 de la página 48 del documento WO 08/020079. No se pretende que las secuencias de aminoácidos que contienen D-aminoácidos estén abarcadas por esta definición. Cualquier secuencia de aminoácidos que contenga aminoácidos modificados postraduccionalmente puede describirse como la secuencia de aminoácidos que se traduce inicialmente utilizando los símbolos mostrados en esta Tabla A-2 con las posiciones modificadas; p. ej., hidroxilaciones o glucosilaciones, pero estas modificaciones no se mostrarán explícitamente en la secuencia de aminoácidos. Cualquier péptido o proteína que se puede expresar como una secuencia modificada de conexiones, reticulaciones y caperuzas finales, enlaces no peptídicos, etc., está abarcado por esta definición, como se sabe en la técnica.

Los términos "proteína", "péptido", "proteína/péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente a lo largo de la divulgación y cada uno tiene el mismo significado para los propósitos de esta divulgación. Cada término se refiere a un compuesto orgánico constituido por una cadena lineal de dos o más aminoácidos. El compuesto puede tener diez o más aminoácidos; veinticinco o más aminoácidos; cincuenta o más aminoácidos; cien o más aminoácidos, doscientos o más aminoácidos, e incluso trescientos o más aminoácidos. El experto apreciará que los polipéptidos comprenden en general menos aminoácidos que las proteínas, aunque no hay un punto de corte reconocido en la técnica del número de aminoácidos que distingue a un polipéptido y una proteína; que los polipéptidos pueden generarse por síntesis química o métodos recombinantes; y que las proteínas generalmente se generan *in vitro* o *in vivo* por métodos recombinantes como se sabe en la técnica. Por convención, el enlace amida en la estructura primaria de los polipéptidos está en el orden en que se escriben los aminoácidos, en el cual el extremo amino (extremo N) de un polipéptido está siempre a la izquierda, mientras que el extremo ácido (extremo C) está a la derecha.

Una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos se considera que está "(en) (forma) (esencialmente) aislada" - por ejemplo, en comparación con el medio de reacción o medio de cultivo del que se ha obtenido - cuando se ha separado de al menos otro componente con el que se suele asociar 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 secundario. En particular, una secuencia de ácido nucleico o 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. Un ácido nucleico o aminoácido que está "en forma (esencialmente) aislada" es preferentemente esencialmente homogéneo, determinado mediante una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos "comprenden" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o "consisten esencialmente en" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, esto puede significar que la última secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos se ha incorporado en la primera secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, mencionada pero más habitualmente esto generalmente significa que la primera secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos mencionada comprende en su secuencia un tramo de nucleótidos o residuos aminoacídicos, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que la última secuencia, independientemente de cómo se haya generado u obtenido realmente la primera secuencia mencionada (que puede ser, por ejemplo, por cualquier método adecuado descrito en el presente documento). A modo de ejemplo no limitante, cuando se dice que un polipéptido de la invención comprende un dominio variable único de inmunoglobulina ("ISVD"), esto puede significar que dicha secuencia del dominio variable único de inmunoglobulina se ha incorporado a la secuencia del polipéptido de la invención, pero más habitualmente esto generalmente significa que el polipéptido de la invención contiene en su

secuencia la secuencia de los dominios variables únicos de inmunoglobulina, independientemente de cómo se haya generado u obtenido dicho polipéptido de la invención. Además, cuando se dice que una secuencia de ácido nucleico o nucleótidos comprende otra secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de ácido nucleico o nucleótidos mencionada es preferentemente tal que, cuando se expresa en un producto de expresión (p. ej., un polipéptido), la secuencia de aminoácidos codificada por la última secuencia de nucleótidos forma parte de dicho producto de expresión (es decir, que la última secuencia de nucleótidos está en el mismo marco de lectura que la primera secuencia de ácido nucleico o nucleótidos mayor mencionada). Además, cuando se dice que un constructo de la invención comprende un polipéptido o ISVD, esto puede significar que dicho constructo al menos abarca dicho polipéptido o ISVD, respectivamente, pero más habitualmente esto significa que dicho constructo abarca grupos, residuos (p. ej., residuos de aminoácidos), restos y/o unidades de unión además de dicho polipéptido o ISVD, independientemente de cómo dicho polipéptido o ISVD esté conectado a dichos grupos, residuos (p. ej., residuos aminoácidos), restos y/o unidades de unión e independientemente de cómo se haya generado u obtenido dicho constructo.

"Consiste esencialmente en" significa que el ISVD utilizado en la invención es exactamente el mismo que el ISVD de la invención o corresponde a un ISVD de la invención, teniendo un número limitado de residuos aminoácidos, tales como 1-20 residuos aminoácidos, por ejemplo, 1-10 residuos aminoácidos y preferentemente 1-6 residuos aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos aminoácidos, añadidos al extremo amino terminal, al extremo carboxi terminal, o tanto al extremo amino terminal como al extremo carboxi terminal del ISVD.

Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "identidad secuencial" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos puede calcularse 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] por [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos] y multiplicando por [100 %], en donde 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). Como alternativa, el grado de identidad secuencial entre dos o más secuencias de nucleótidos se puede calcular utilizando un algoritmo informático conocido para la alineación de secuencias, tal como NCBI Blast v2.0, utilizando la configuración estándar. Algunas otras técnicas, algoritmos informáticos y configuraciones para determinar el grado de identidad secuencial se describen, por ejemplo, en los documentos WO 04/037999, EP 0967284, EP 1085089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 y GB 2357768. Por lo general, para el propósito de determinar el porcentaje de "identidad secuencial" entre dos secuencias de nucleótidos de acuerdo con el método de cálculo descrito 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.

Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de "identidad secuencial" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos (también denominado en el presente documento "identidad de aminoácidos") puede calcularse dividiendo [el número de residuos aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos aminoácidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos] por [el número total de residuos aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicando por [100 %], en donde cada delección, inserción, sustitución o adición de un residuo aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos - en comparación con la primera secuencia de aminoácidos - se considera como una diferencia en un único residuo aminoácido (posición), es decir, como una "diferencia de aminoácidos" como se define en el presente documento. Como alternativa, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede calcular utilizando un algoritmo informático conocido, tales como los mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad secuencial para secuencias de nucleótidos, de nuevo utilizando la configuración estándar. Por lo general, para el propósito de determinar el porcentaje de "identidad secuencial" entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo descrito anteriormente en el presente documento, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos aminoácidos se tomará como la "primera" secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la "segunda" secuencia de aminoácidos.

Además, al determinar el grado de identidad secuencial entre dos secuencias de aminoácidos, el experto puede tener en cuenta las llamadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", que generalmente pueden describirse como sustituciones de aminoácidos en las que un residuo aminoácido es reemplazado por otro residuo aminoácido de estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia en la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones conservadoras de aminoácidos son muy conocidas en la técnica, por ejemplo, en los documentos WO 04/037999, GB 335768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y los tipos y/o combinaciones (preferidos) de tales sustituciones pueden seleccionarse basándose en el contenido pertinente del documento WO 04/037999, así como WO 98/49185 y de las referencias adicionales citadas en ellos.

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

Cualquier sustitución de aminoácidos aplicada a los polipéptidos descritos en el presente documento también puede basarse 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 posibilidades de formación de estructuras desarrollados por Chou y Fasman (Bioquímica 13: 211, 1974; Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978), y en el análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollado por Eisenberg *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984), Kyte y Doolittle (J. Molec. Biol. 157: 105-132, 1981), y Goldman *et al.* (Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986). La información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de Nanobodies se proporciona en la descripción del presente documento y en la técnica anterior general citada anteriormente. Asimismo, para este propósito, la estructura cristalina de un dominio V_{HH} de una llama se proporciona, por ejemplo, en Desmyter *et al.* (Nature Structural Biology, 3: 803, 1996), Spinelli *et al.* (Natural Structural Biology, 3: 752-757, 1996) y Decanniere *et al.* (Structure, 7 (4): 361, 1999). Se puede encontrar más información acerca de algunos de los residuos aminoacídicos que en los dominios V_H convencionales forman la interfaz V_H / V_L y posibles sustituciones camelizantes en estas posiciones en la técnica anterior citada anteriormente.

Se dice que las secuencias de aminoácidos y las secuencias de ácidos nucleicos son "exactamente iguales" si tienen una identidad de secuencia de un 100 % (como se define en el presente documento) a lo largo de toda su longitud.

Al comparar dos secuencias de aminoácidos, el término "diferencia de aminoácido(s)" se refiere a una inserción, delección o sustitución de un único residuo aminoacídico 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. Más particularmente, en los ISVD y/o polipéptidos de la presente invención, el término "diferencia de aminoácido(s)" se refiere a una inserción, delección o sustitución de un único residuo aminoacídico en una posición de la secuencia CDR especificada en b), d) o f), en comparación con la secuencia CDR de a), c) o e) respectivamente; se entiende que la secuencia CDR de b), d) y f) puede contener uno, dos, tres, cuatro o un máximo de cinco de tales diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR de a), c) o e) respectivamente.

La "diferencia de aminoácido(s)" puede ser una, dos, tres, cuatro o como máximo cinco sustituciones, delecciones o inserciones, o cualquier combinación de estas, que mejoran las propiedades de la molécula que se une a ADAMTS5 de la invención, tal como el polipéptido de la invención, o que al menos no restan demasiado de las propiedades deseadas o del equilibrio o combinación de propiedades deseadas de la molécula que se une a ADAMTS5 de la invención, tal como el polipéptido de la invención. A este respecto, la molécula que se une a ADAMTS5 de la invención resultante, tal como el polipéptido de la invención, debe al menos unirse a ADAMTS5 con la misma, aproximadamente la misma, o una afinidad mayor en comparación con el polipéptido que comprende la una o más secuencias CDR sin la una, dos, tres, cuatro o como máximo cinco sustituciones, delecciones o inserciones. La afinidad se puede medir mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, pero se mide preferentemente mediante un método como se describe en la sección de los ejemplos.

A este respecto, la secuencia de aminoácidos de las CDR de acuerdo con b), d) y/o f) como se indica a continuación, puede ser una secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con a), c) y/o e) respectivamente mediante la maduración de la afinidad utilizando una o más técnicas de maduración de la afinidad conocidas *per se* o como se describen en los Ejemplos. Por ejemplo, y dependiendo del organismo hospedador utilizado para expresar el polipéptido de la invención, tales delecciones y/o sustituciones pueden diseñarse de tal manera que se eliminen ese uno o más sitios para la modificación postraduccional (tales como uno o más sitios de glucosilación), como estará dentro de las competencias del experto en la técnica (véanse los Ejemplos).

Una "familia Nanobody", " familia V_{HH}" o "familia" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva se refiere a un grupo de secuencias de Nanobodies y / o V_{HH} que tienen longitudes idénticas (es decir, tienen el mismo número de aminoácidos dentro de su secuencia) y de las cuales la secuencia de aminoácidos entre la posición 8 y la posición 106 (de acuerdo con la numeración de Kabat) tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de un 89 % o más.

Los términos "epítipo" y "determinante antigénico", que se pueden utilizar de forma intercambiable, se refieren a la parte de una macromolécula, tal como un polipéptido o proteína que es reconocida por moléculas que se unen a antígenos, tales como inmunoglobulinas, anticuerpos convencionales, dominios variables únicos de inmunoglobulina y/o polipéptidos de la invención, y más particularmente por el sitio de unión a antígenos de dichas moléculas. Los epítipos definen el sitio mínimo de unión para una inmunoglobulina, y por lo tanto representan la diana de especificidad de una inmunoglobulina.

La parte de una molécula que se une a antígenos (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo convencional, un dominio variable único de inmunoglobulina y/o un polipéptido de la invención) que reconoce el epítipo se denomina "paratopo".

Una secuencia de aminoácidos (tal como un dominio variable único de inmunoglobulina, un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o generalmente una proteína que se une a antígenos o un polipéptido o un fragmento de estos) que puede "unirse a" o "unirse específicamente a", que "tiene afinidad por" y/o que "tiene especificidad por" un determinado epítipo, antígeno o proteína (o por al menos una parte, fragmento o epítipo de estos) se dice que está "contra" o "dirigido contra" dicho epítipo, antígeno o proteína o es una molécula de "unión" con respecto a dicho epítipo, antígeno o proteína, o se dice que es "anti"-epítipo, "anti"-antígeno o "anti"-proteína (p. ej., "anti"-ADAMTS5).

La afinidad denota la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se da comúnmente como la K_D , o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como una constante de asociación, K_A , que es igual a $1/K_D$ y tiene unidades de $(\text{mol/litro})^{-1}$ (o M^{-1}). En la presente memoria descriptiva, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas se expresará principalmente en términos del valor de K_D de su interacción; estando claro para el experto que en vista de la relación $K_A = 1/K_D$, también se puede utilizar la especificación de la fuerza de la interacción molecular por su valor de K_D para calcular el valor de K_A correspondiente. El valor de K_D caracteriza la fuerza de una interacción molecular también en sentido termodinámico, ya que está relacionado con el cambio de energía libre (ΔG) de unión por la conocida relación $\Delta G = RT \ln(K_D)$ (de manera equivalente $\Delta G = -RT \ln(K_A)$), donde R es igual a la constante del gas, T es igual a la temperatura absoluta y $\ln$ denota el logaritmo natural.

Las K_D para las interacciones biológicas que se consideran significativas (p. ej., específicas) están típicamente en el intervalo de 10^{-12} M (0,001 nm) a 10^{-5} M (10 000 nm). Cuanto más fuerte es una interacción, menor es su K_D .

La K_D también puede expresarse como la relación de la constante de velocidad de disociación de un complejo, indicada como k_{off} , a la velocidad de su asociación, indicada como k_{on} (de modo que $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ y $K_A = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$). La velocidad de disociación k_{off} tiene unidades de s^{-1} (donde s es la notación de unidad del SI de segundo). La velocidad de asociación k_{on} tiene unidades $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La velocidad de asociación puede variar entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, acercándose a la constante de velocidad de asociación limitada por la difusión para las interacciones bimoleculares. La velocidad de disociación se relaciona con la semivida de una interacción molecular dada mediante la relación $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$. La velocidad de disociación puede variar entre 10^{-6} s^{-1} (complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de días múltiples) y 1 s^{-1} ($t_{1/2} = 0,69 \text{ s}$).

La unión específica de una proteína de unión de antígenos, tal como un ISVD, a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluidos, por ejemplo, ensayos de unión de saturación y/o ensayos de unión competitivos, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos competitivos sándwich, y las diferentes variantes de estos conocidas *per se* en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente documento.

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas se puede medir a través de diferentes técnicas conocidas *per se*, tales como la conocida técnica de biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) (véase, por ejemplo, Ober *et al.* 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559) donde una molécula es inmovilizada en el chip del biosensor y la otra molécula se hace pasar sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo que producen mediciones de k_{on} , k_{off} y, por lo tanto, valores de K_D (o K_A). Esto puede realizarse, por ejemplo, utilizando los conocidos instrumentos BIACORE® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). El ensayo de exclusión cinética (KINEXA®) (Drake *et al.* 2004, Analytical Biochemistry 328: 35-43) mide eventos de unión en solución sin marcar los compañeros de unión y se basa en la exclusión cinética de la disociación de un complejo. El análisis de afinidad en solución también se puede realizar utilizando el sistema de inmunoensayo GYROLAB®, que proporciona una plataforma para el bioanálisis automatizado y la rápida respuesta para las muestras (Fraley *et al.* 2013, Bioanalysis 5: 1765-74), o ELISA.

También estará claro para el experto que la K_D medida puede corresponder a la K_D aparente si el proceso de medida influye de alguna manera en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas involucradas, por ejemplo, mediante artefactos relacionados con el recubrimiento en el biosensor de una molécula. Además, se puede medir una K_D aparente si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la otra molécula. En dicha situación, la afinidad medida puede verse afectada por la afección de la interacción de las dos moléculas. En

particular, la medida exacta de K_D puede ser muy laboriosa y, como consecuencia, a menudo se determinan los valores de K_D aparente para evaluar la fuerza de unión de dos moléculas. Cabe señalar que, siempre que todas las medidas se realicen de manera uniforme (p. ej., manteniendo las condiciones de ensayo sin cambios), las mediciones de K_D aparente pueden utilizarse como una aproximación de la K_D verdadera y, por lo tanto, en el presente documento, la K_D y K_D aparente deben tratarse con la misma importancia o relevancia.

El término "especificidad" se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos a los que se puede unir una molécula que se une a antígenos o proteína que se une a antígenos particular (tal como un ISVD o polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína que se une a antígenos puede determinarse en función de la afinidad y/o aidez, por ejemplo, como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079, que también describe algunas técnicas preferidas para medir la unión entre una molécula que se une a antígenos (tal como un polipéptido o ISVD de la invención) y el antígeno pertinente. Normalmente, las proteínas que se unen a antígenos (tales como los ISVD y/o polipéptidos de la invención) se unen a su antígeno con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferentemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferentemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litro/ moles o más, y preferentemente de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y más preferentemente de 10^8 a 10^{12} litro/moles). Generalmente, se considera que cualquier valor de K_D superior a 10^{-4} mol/litro (o cualquier valor de K_A inferior a 10^4 litros/mol) indica una unión no específica. Preferentemente, un ISVD monovalente de la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 200 nM, más preferentemente inferior a 10 nM, tal como inferior a 500 pM, tal como, p. ej., entre 10 y 5 pM o inferior. También se hace referencia al párrafo n) de las páginas 53-56 del documento WO 08/020079.

Se dice que un ISVD y/o polipéptido es "específico para" una (primera) diana o antígeno en comparación con otra (segunda) diana o antígeno cuando se une al primer antígeno con una afinidad (como se ha descrito anteriormente, y convenientemente expresada como un valor de K_D , valor de K_A , velocidad K_{off} y/o velocidad K_{on}) que es al menos 10 veces, tal como por lo menos 100 veces, y preferentemente al menos 1000 veces o más mejor que la afinidad con la que el ISVD y/o polipéptido se une a la segunda diana o antígeno. Por ejemplo, el ISVD y/o polipéptido pueden unirse a la primera diana o antígeno con un valor de K_D que es al menos 10 veces inferior, tal como al menos 100 veces inferior, y preferentemente al menos 1000 veces inferior o incluso inferior que eso, a la K_D con la que dicho ISVD y/o polipéptido se unen a la segunda diana o antígeno. Preferentemente, cuando un ISVD y/o polipéptido es "específico para" una primera diana o antígeno en comparación con una segunda diana o antígeno, se dirige contra (como se define en el presente documento) dicha primera diana o antígeno, pero no se dirige contra dicha segunda diana o antígeno.

La unión específica de una proteína de unión de antígenos a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluidos, por ejemplo, ensayos de unión de saturación y/o ensayos de unión competitivos, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y las diferentes variantes de estos conocidas en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente documento.

Un enfoque preferido que se puede utilizar para evaluar la afinidad es el procedimiento ELISA de 2 pasos (ensayo de inmunoabsorción enzimática) de Friguet *et al.* 1985 (J. Immunol. Methods 77: 305-19). Este método establece una medida del equilibrio de unión en fase de solución y evita posibles artefactos relacionados con la adsorción de una de las moléculas en un soporte tal como el plástico. Como quedará claro para el experto, la constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente. Los métodos para determinar la constante de disociación serán evidentes para el experto, y por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079.

Finalmente, cabe señalar que en muchas situaciones el científico experimentado puede juzgar conveniente determinar la afinidad de unión relativa a alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la fuerza de unión entre las moléculas A y B, se puede, p. ej., utilizar una molécula de referencia C que se sabe que se une a B y que está marcada adecuadamente con un grupo fluoróforo o cromóforo u otro resto químico, tal como biotina para la detección fácil en un ELISA o FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) u otro formato (el fluoróforo para la detección de fluorescencia, el cromóforo para la detección de absorción de luz, la biotina para la detección por ELISA mediada por estreptavidina). Típicamente, la molécula de referencia C se mantiene en una concentración fija y la concentración de A se varía para una concentración o cantidad dada de B. Como resultado, se obtiene un valor de CI_{50} correspondiente a la concentración de A en la que la señal medida para C en ausencia de A se reduce a la mitad. Siempre que se conozca $K_{D\text{ ref}}$, la K_D de la molécula de referencia, así como la concentración total c_{ref} de la molécula de referencia, se puede obtener la K_D aparente para la interacción A-B a partir de la siguiente fórmula: $K_D = CI_{50} / (1 + c_{\text{ref}} / K_{D\text{ ref}})$. Tenga en cuenta que si $c_{\text{ref}} \ll K_{D\text{ ref}}$, $K_D \approx CI_{50}$. Siempre que la medición de la CI_{50} se realice de manera sistemática (p. ej., manteniendo la c_{ref} fija) para las moléculas de unión que se comparan, la diferencia de la fuerza o estabilidad de una interacción molecular puede evaluarse comparando la CI_{50} y esta medición se considera equivalente a la K_D o a K_D aparente a lo largo de este texto.

La concentración inhibidora semimáxima (CI₅₀) también puede ser una medida de la eficacia de un compuesto para inhibir una función biológica o bioquímica, p. ej., un efecto farmacológico. Esta medida cuantitativa indica cuánto del polipéptido o ISVD (p. ej., un Nanobody) se necesita para inhibir un proceso biológico dado (o componente de un proceso, es decir, una enzima, célula, receptor celular, quimiotaxis, anaplasia, metástasis, invasividad, etc.) a la mitad. En otras palabras, es la concentración inhibidora (CI) semimáxima (50 %) de una sustancia (CI 50 % o CI₅₀). Los valores de CI₅₀ se pueden calcular para un antagonista dado tal como el polipéptido o ISVD (p. ej., un Nanobody) de la invención determinando la concentración necesaria para inhibir la mitad de la respuesta biológica máxima del agonista. La K_D de un fármaco se puede determinar construyendo una curva dosis-respuesta y examinando el efecto de diferentes concentraciones de antagonista tal como el polipéptido o ISVD (p. ej., un Nanobody) de la invención para revertir la actividad del agonista.

El término concentración eficaz semimáxima (CE₅₀) se refiere a la concentración de un compuesto que induce una respuesta a medio camino entre la base de referencia y el máximo después de un tiempo de exposición especificado. En el contexto actual se utiliza como una medida de la potencia de un polipéptido, ISVD (p. ej., un Nanobody). La CE₅₀ de una curva de dosis-respuesta graduada representa la concentración de un compuesto donde se observa un 50 % de su efecto máximo. La concentración se expresa preferentemente en unidades molares.

En los sistemas biológicos, pequeños cambios en la concentración del ligando normalmente dan como resultado cambios rápidos en la respuesta, después de una función sigmoideal. El punto de inflexión en el que el aumento de la respuesta con el aumento de la concentración de ligando comienza a ralentizarse es la CE₅₀. Esto se puede determinar matemáticamente por derivación de la línea de mejor ajuste. Confiar en un gráfico para la estimación es conveniente en la mayoría de los casos. En caso de que la CE₅₀ se proporcione en la sección de ejemplos, los experimentos se diseñaron para reflejar la K_D de la manera más precisa posible. En otras palabras, los valores de CE₅₀ pueden considerarse entonces como valores de K_D. El término "K_D promedio" se refiere al valor de K_D promedio obtenido en al menos 1, pero preferentemente más de 1, tal como al menos 2 experimentos. El término "promedio" se refiere al término matemático "promedio" (sumas de los datos divididas por el número de artículos en los datos).

También está relacionado con la CI₅₀ que es una medida de la inhibición de un compuesto (50 % de inhibición). Para ensayos de unión competitiva y ensayos de antagonista funcional la CI₅₀ es la medida de resumen más común de la curva de dosis-respuesta. Para los ensayos de agonista/estimulador la medida de resumen más común es la CE₅₀.

La constante de inhibición (K_i) es una indicación de cuán potente es un inhibidor; es la concentración requerida para producir una inhibición semimáxima. A diferencia de la CI₅₀, que puede cambiar dependiendo de las condiciones experimentales, la K_i es un valor absoluto y a menudo se denomina constante de inhibición de un fármaco. La constante de inhibición K_i se puede calcular usando la ecuación de Cheng-Prusoff:

$$K_i = \frac{CI_{50}}{\frac{[L]}{K_D} + 1}$$

en la que [L] es la concentración fija del ligando.

El término "potencia" de un polipéptido y/o ISVD de la invención, tal como se utiliza en el presente documento, es una función de la cantidad de polipéptido y/o ISVD de la invención requerida para que ocurra su efecto específico. Se refiere a la capacidad de dicho polipéptido y/o ISVD de la invención para modular y/o inhibir parcial o totalmente una actividad de ADAMTS5. Más particularmente, puede referirse a la capacidad de dicho polipéptido y/o ISVD para reducir o incluso inhibir totalmente una actividad de ADAMTS5 tal como se define en el presente documento. Como tal, puede referirse a la capacidad de dicho polipéptido y/o ISVD para inhibir una actividad de ADAMTS5, tal como una actividad enzimática, tal como la proteólisis, p. ej., la actividad proteasa y/o las actividades endopeptidasas, así como la unión de un sustrato, incluidos, entre otros, agrecano, versicano, brevicano, neurocano, decorina y/o biglucano, preferentemente escisión de agrecano. Dicho polipéptido y/o ISVD preferentemente ejerce un efecto antagonista sobre la actividad agrecanasa de ADAMTS5. La potencia se puede medir con cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica o descrito en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, "actividad agrecanasa" se define como la escisión proteolítica del agrecano.

La "eficacia" del polipéptido de la invención mide la fuerza máxima del efecto en sí, a concentraciones saturantes de polipéptido. La eficacia indica la respuesta máxima alcanzable del polipéptido de la invención. Se refiere a la capacidad de un polipéptido para producir el efecto (terapéutico) deseado.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido se une a ADAMTS5 con una K_D entre 1E⁻⁰⁷ M y 1E⁻¹³ M, tal como entre 1E⁻⁰⁸ M y 1E⁻¹² M,

preferentemente como máximo $1\text{E}^{-07}\text{ M}$, preferentemente más baja que $1\text{E}^{-08}\text{ M}$ o $1\text{E}^{-09}\text{ M}$, o incluso más baja que $1\text{E}^{-10}\text{ M}$, tal como $5\text{E}^{-11}\text{ M}$, $4\text{E}^{-11}\text{ M}$, $3\text{E}^{-11}\text{ M}$, $2\text{E}^{-11}\text{ M}$, $1,7\text{E}^{-11}\text{ M}$, $1\text{E}^{-11}\text{ M}$, o incluso $5\text{E}^{-12}\text{ M}$, $4\text{E}^{-12}\text{ M}$, $3\text{E}^{-12}\text{ M}$, $1\text{E}^{-12}\text{ M}$, por ejemplo, determinada por Gyrolab o KinExA.

5 En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido modula ADAMTS5 con una CE_{50} de entre $1\text{E}^{-07}\text{ M}$ y $1\text{E}^{-12}\text{ M}$, tal como entre $1\text{E}^{-08}\text{ M}$ y $1\text{E}^{-11}\text{ M}$, por ejemplo, según se determina mediante ELISA de unión.

10 En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido se une a ADAMTS5 con una velocidad de disociación inferior a $5\text{E}^{-04}\text{ s}^{-1}$, tal como inferior a $1\text{E}^{-04}\text{ s}^{-1}$ o $5\text{E}^{-05}\text{ s}^{-1}$, o incluso inferior a $1\text{E}^{-05}\text{ s}^{-1}$, por ejemplo, determinada mediante SPR.

15 En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido inhibe una actividad de ADAMTS5 con una CI_{50} de entre $1\text{E}^{-07}\text{ M}$ y $1\text{E}^{-12}\text{ M}$, tal como entre $1\text{E}^{-08}\text{ M}$ y $1\text{E}^{-11}\text{ M}$, por ejemplo, según se determina mediante el ensayo FRET humano o AlphaLISA humano.

20 En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido inhibe una actividad enzimática de ADAMTS5 con una CI_{50} de como máximo $1\text{E}^{-07}\text{ M}$, preferentemente $1\text{E}^{-08}\text{ M}$, $5\text{E}^{-09}\text{ M}$, o $4\text{E}^{-9}\text{ M}$, $3\text{E}^{-9}\text{ M}$, $2\text{E}^{-9}\text{ M}$, tal como $1\text{E}^{-9}\text{ M}$.

25 Se dice que una secuencia de aminoácidos, tal como un ISVD o un polipéptido, presenta "reactividad cruzada" para dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes (tales como, p. ej., ADAMTS5 de diferentes especies de mamíferos, tales como, p. ej., ADAMTS5 humana, ADAMTS5 bovina, ADAMTS5 de rata, ADAMTS5 de cobaya, ADAMTS5 de ratón o ADAMTS5 de macaco cangrejero) si es específico para (según se define en el presente documento) estos diferentes antígenos o determinantes antigénicos. Se apreciará que se puede considerar que un ISVD o un polipéptido presenta reactividad cruzada, aunque la afinidad de unión por los dos diferentes antígenos puede diferir, tal como por un factor de 2, 5, 10, 50, 100 o incluso más, siempre que sea específico para (como se define en el presente documento) estos diferentes antígenos o determinantes antigénicos.

30 ADAMTS5 también se conoce como ADAMTS11, ADMP-2 o Agrecanasa-2.

La información estructural pertinente para ADAMTS5 puede encontrarse, por ejemplo, en los Números de Acceso de UniProt, como se muestran en la Tabla 1 a continuación (véase la Tabla B).

35 Tabla 1

Ac. proteína	Gen	Organismo	SEQ ID NO:
Q9UNA0	ADAMTS5	<i>H.sapiens</i>	149
Q9TT92	ADAMTS5	<i>B.taurus</i>	150
Q6TY19	ADAMTS5	<i>R.norvegicus</i>	151
H0VFP0	ADAMTS5	<i>Cavia Porcellus</i>	152
Q9R001	ADAMTS5	<i>M.musculus</i>	153
F6Z3S6	ADAMTS5	<i>M.mulatto</i>	154

"ADAMTS5 humana" se refiere a ADAMTS5 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 149. En un aspecto el polipéptido de la invención se une específicamente a ADAMTS5 de *Human sapiens*, *Mus musculus*, *Cavia porcellus*, *Bos taurus*, *Macaca mulatta* y/o *Rattus norvegicus*, preferentemente ADAMTS5 humana, preferentemente la SEQ ID NO: 149.

45 Los términos "bloqueo-(cruzado)", "bloqueado-(de manera cruzada)", "que bloquea-(de manera cruzada)", "unión competitiva", "competición-(cruzada)", "que compite-(de manera cruzada)" y "competencia"-(cruzada)" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a la capacidad de una inmunoglobulina, anticuerpo, ISVD, polipéptido u otro agente de unión para interferir con la unión de otras inmunoglobulinas, anticuerpos, ISVD, polipéptidos o agentes que se unen a una diana determinada. El grado en que una inmunoglobulina, anticuerpo, ISVD, polipéptido u otro agente de unión puede interferir con la unión de otro a la diana, y por lo tanto si puede decirse que hay un bloqueo cruzado, puede determinarse utilizando ensayos de unión competitiva, que son comunes en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante el cribado de ISVD purificados contra ISVD mostrados en fagos en un ELISA competitivo. Los ensayos de bloqueo cruzado cuantitativo particularmente adecuados incluyen el ELISA.

Otros métodos para determinar si una inmunoglobulina, anticuerpo, ISVD, polipéptido u otro agente de unión dirigido contra una diana bloquea-(de manera cruzada), es capaz de bloquear (de manera cruzada), se une

competitivamente o es competitivo-(de manera cruzada), como se define en el presente documento, pueden evaluarse mediante un "ensayo sándwich" basado en SPR, tal como, por ejemplo, el descrito en la sección de Ejemplos. Otros métodos adecuados se describen, p. ej., en Xiao-Chi Jia *et al.* (Journal of Immunological Methods 288: 91-98, 2004), Miller *et al.* (Journal of Immunological Methods 365: 118-125, 2011).

En consecuencia, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, tal como el representado por la SEQ ID NO: 2 (consulte la Tabla A-1), en donde dicho polipéptido compite con un polipéptido de bloqueo cruzado, por ejemplo, según se determina por ELISA competitivo.

La presente divulgación se refiere a un método para determinar competidores, tales como polipéptidos, que compiten con un polipéptido tal como se describe en el presente documento, tal como los representados por una cualquiera de las SEQ ID NO:s 2, 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 o 18, en donde el polipéptido como se describe en el presente documento compite con o bloquea de manera cruzada al competidor, tal como un polipéptido, en la unión a ADAMTS5, tal como, por ejemplo, ADAMTS5 humana (SEQ ID NO: 149), en donde la unión a ADAMTS5 del competidor se reduce en al menos un 5 %, tal como un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o incluso más, tal como un 80 %, 90 % o incluso un 100 % (es decir, prácticamente indetectable en un ensayo dado) en presencia de un polipéptido de la invención, en comparación con la unión a ADAMTS5 del competidor en ausencia del polipéptido de la invención. La competencia y el bloqueo cruzado pueden determinarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, el ensayo FACS o ELISA competitivo. En un aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido como se define en las reivindicaciones, en donde dicho polipéptido bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 de al menos uno de los polipéptidos representados por la SEQ ID NO:s 2, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 o 18 y/o es bloqueado de manera cruzada en su unión a ADAMTS5 por al menos uno de los polipéptidos representados por la SEQ ID NO:s 2, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 o 18.

La presente divulgación también se refiere a los competidores que compiten con un polipéptido como se describe en el presente documento, tal como la SEQ ID NO:s 2, 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 o 18, en donde el competidor compite con o bloquea de manera cruzada el polipéptido como se describe en el presente documento en su unión a ADAMTS5, en donde la unión a ADAMTS5 del polipéptido de la invención se reduce en al menos un 5 %, tal como un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o incluso más, tal como un 80 %, o incluso más tal como al menos un 90 % o incluso un 100 % (es decir, prácticamente indetectable en un ensayo dado) en presencia de dicho competidor, en comparación con la unión a ADAMTS5 por el polipéptido de la invención en ausencia de dicho competidor. En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido que bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 de un polipéptido de la invención, tal como una de las SEQ ID NO:s 2, 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 o 18 y/o experimenta un bloqueo cruzado en su unión a ADAMTS5 por parte de al menos una de las SEQ ID NO:s 2, 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 o 18, preferentemente, en donde dicho polipéptido comprende al menos un VH, VL, dAb o ISVD que se une específicamente a ADAMTS5, en donde la unión a ADAMTS5 modula una actividad de ADAMTS5.

Las "actividades de ADAMTS5" incluyen, entre otros, actividades enzimáticas, tales como proteólisis, p. ej., actividad proteasa (también llamada actividad proteinasa o peptidasa), y actividades endopeptidasa, por un lado, y las actividades de los exositos, tales como, por ejemplo, el reconocimiento y/o unión al sustrato, p. ej., por un dominio similar a la desintegrina, repetición similar a trombospodina central de tipo I (TS), dominio rico en cisteína, región espaciadora y/o motivos de TS adicionales. Las actividades de ADAMTS5 incluyen la unión y/o proteólisis de sustratos tales como las proteínas extracelulares proteoglucanos con sulfato de condroitina que se unen a hialuronano (CSPG, por sus siglas en inglés), tales como agregcano, versicano, brevicano, neurocano, decorina y biglucano. Tal como se utiliza en el presente documento, la proteólisis es la descomposición de las proteínas en polipéptidos más pequeños o aminoácidos por la hidrólisis de los enlaces péptidos que conectan los aminoácidos entre sí en una cadena polipeptídica.

En el contexto de la presente invención, "modulación" o "modular" generalmente significa alterar una actividad por ADAMTS5, medida utilizando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (tales como los mencionados en el presente documento). En particular, "modulación" o "modular" puede significar reducir o inhibir una actividad de ADAMTS5, o como alternativa aumentar una actividad de ADAMTS5, medida utilizando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (por ejemplo, tal como los mencionados en el presente documento), en al menos un 1 %, preferentemente al menos un 5 %, tal como al menos un 10 % o al menos un 25 %, por ejemplo, en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o un 90 % o más, en comparación con la actividad de ADAMTS5 en el mismo ensayo en las mismas condiciones pero sin la presencia de un ISVD o polipéptido de la invención.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido modula una actividad de ADAMTS5, preferentemente inhibiendo una actividad de ADAMTS5.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido inhibe la actividad proteasa de ADAMTS5, por ejemplo, inhibe la proteólisis de un sustrato, tal como agrecano, versicano, brevicano, neurocano, decorina, y/o biglucano.

5 En consecuencia, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido bloquea la unión de ADAMTS5 a un sustrato, tal como agrecano, versicano, brevicano, neurocano, decorina, y/o biglucano, en donde dicho sustrato es preferentemente agrecano.

10 En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido ejerce un bloque en la unión de ADAMTS5 a agrecano de al menos un 20 %, tal como, al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso más, por ejemplo, determinado por ELISA.

15 En un aspecto la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido ejerce un efecto antagonista sobre o inhibe una actividad de ADAMTS5, tal como (i) una actividad proteasa, preferentemente escisión de agrecano, versicano, brevicano, neurocano, decorina, y/o biglucano, preferentemente escisión de agrecano; preferentemente ejerce un efecto antagonista sobre la actividad agrecanasa de ADAMTS5; (ii) unión de un sustrato a ADAMTS5, tal como un exosito de ADAMTS5, por ejemplo, el dominio similar a la desintegrina, la repetición similar a trombospondina central de tipo I (TS), el dominio rico en cisteína, la región espaciadora o el motivo TS adicional.

20 En consecuencia, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho polipéptido inhibe la actividad proteasa de ADAMTS5, preferentemente en al menos un 5 %, tal como un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o incluso más, tal como al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso más, según se determina mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, como, por ejemplo, mediante ensayos de inhibición enzimática o como se describe en la sección de Ejemplos.

25 Aunque las ADAMS, ADAMTS y MMP comparten un sitio de unión a agrecano que es muy similar tanto en secuencia como en forma general, p. ej., los dominios catalíticos de ADAMTS4 y ADAMTS5 comparten un alto grado de similitud de secuencia, los inventores fueron capaces de identificar ISVD que eran específicos de la diana, como se demuestra en los ejemplos. La especificidad de la diana también evitaría o al menos limitaría el síndrome musculoesquelético, que es un efecto secundario causado por inhibidores de amplio espectro. En un aspecto, la divulgación se refiere a una molécula que se une a ADAMTS5, tal como un ISVD y un polipéptido de la invención, en donde dicha molécula que se une a ADAMTS5 no se une a ADAMTS4, ADAMTS1, ADAMTS15, MMP1 y/o MMP14 (tipo de membrana). Preferentemente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define en el presente documento, en donde dicho ISVD que se une a ADAMTS5 no se une a ADAMTS4, MMP1 o MMP14.

30 A menos que se indique otra cosa, los términos "inmunoglobulina" y "secuencia de inmunoglobulina", independientemente de si se utilizan en el presente documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, se usan como expresión general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales de este, así como todas las partes, dominios o fragmentos de este (incluidos, aunque sin limitación, dominios que se unen a antígenos o fragmentos tales como dominios V_H o dominios V_H/V_L , respectivamente).

35 El término "dominio" (de un polipéptido o proteína) tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene la capacidad de conservar su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos casos pueden ser añadidos, eliminados o transferidos a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio.

40 El término "dominio de inmunoglobulina" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una región globular de una cadena de anticuerpos (tal como, p. ej., una cadena de un anticuerpo de 4 cadenas convencional o de un anticuerpo de cadena pesada), o a un polipéptido que consiste esencialmente en tal región globular. Los dominios de inmunoglobulina se caracterizan por conservar el pliegue de inmunoglobulina característico de las moléculas de anticuerpos, que consiste en un sándwich de dos capas de aproximadamente siete hebras beta antiparalelas dispuestas en dos hojas beta, estabilizadas opcionalmente por un enlace disulfuro conservado.

45 El término "dominio variable de inmunoglobulina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un dominio de inmunoglobulina que consiste esencialmente en cuatro "regiones de almacén", a las que se hace referencia en la técnica y a continuación en el presente documento como "región de almacén 1" o "FR1"; como "región de almacén 2" o "FR2"; como "región de almacén 3" o "FR3"; y como "región de almacén 4" o "FR4", respectivamente; donde las regiones de almacén están interrumpidas por tres "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR", a las que se hace referencia en la técnica y a continuación en el presente documento como "región determinante de la complementariedad 1" o "CDR1"; como "región determinante de la complementariedad 2" o "CDR2"; y como "región determinante de la complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Por lo tanto, la estructura o secuencia general de un dominio variable de inmunoglobulina puede

indicarse de la siguiente manera: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. El dominio o los dominios variables de inmunoglobulina son los que confieren especificidad a un anticuerpo por el antígeno al portar el sitio de unión a antígenos.

5 El término "dominio variable único de inmunoglobulina" (abreviado en el presente documento como "ISVD" o "ISV"), y utilizado intercambiamente con "dominio variable único", define las moléculas en las que el sitio de unión a antígenos está presente en un dominio único de inmunoglobulina y formado por este. Esto establece los dominios variables únicos de inmunoglobulina aparte de las inmunoglobulinas "convencionales" o sus fragmentos, en donde
10 dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables interactúan para formar un sitio de unión a antígenos. Típicamente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L) interactúan para formar un sitio de unión a antígenos. En el último caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tanto de V_H como V_L contribuirán al sitio de unión a antígenos, es decir, un total de 6 CDR estarán involucradas en la formación del sitio de unión a antígenos.

15 En vista de la definición anterior, el dominio de unión a antígenos de un anticuerpo de 4 cadenas convencional (tal como una molécula IgG, IgM, IgA, IgD o IgE; conocida en la técnica) o de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv tal como un fragmento Fv conectado a disulfuro o un fragmento scFv, o un diacuerpo (todo conocido en la técnica) derivado de dicho anticuerpo de 4 cadenas convencional, normalmente no se consideraría un dominio variable único de inmunoglobulina, ya que, en estos casos, la unión al epítipo respectivo de un antígeno
20 normalmente no ocurriría por un dominio de inmunoglobulina (único), sino por un par de dominios de inmunoglobulina (asociados) tales como dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par de dominios de inmunoglobulina V_H - V_L , que se unen conjuntamente a un epítipo del antígeno respectivo.

25 Por el contrario, los ISVD son capaces de unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un ISVD está formado por un único dominio V_{HH} , V_H o V_L . Por tanto, el sitio de unión a antígenos de un ISVD está formado por no más de tres CDR.

30 Como tal, el dominio variable único puede ser una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (p. ej., una secuencia V_L) o un fragmento adecuado de esta; o una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (p. ej., una secuencia V_H o secuencia V_{HH}) o un fragmento adecuado de esta; siempre y cuando sea capaz de formar una única unidad de unión a antígenos (es decir, una unidad funcional de unión a antígenos que consiste esencialmente en el dominio variable único, de tal manera que el dominio único de unión a antígenos no necesita interactuar con otro dominio variable para formar una unidad funcional de unión a antígenos).

35 En una realización de la invención, los ISVD son secuencias de dominio variable de la cadena pesada (p. ej., una secuencia V_H); más específicamente, los ISVD pueden ser secuencias de dominio variable de la cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de la cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

40 Por ejemplo, el ISVD puede ser un anticuerpo de dominio (único) (o un aminoácido que es adecuado para su uso como un anticuerpo de dominio (único)), un "dAb" o dAb (o un aminoácido que es adecuado para su uso como un dAb) o un Nanobody (como se define en el presente documento, y que incluye, entre otros, a un VHH); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de estos.

45 En particular, el ISVD puede ser un Nanobody® (tal como se define en el presente documento) o un fragmento adecuado de este. [Nota: Nanobody®, Nanobodies® y Nanoclone® son marcas comerciales registradas de Ablynx N.V.] Para una descripción general de Nanobodies, se hace referencia a la descripción adicional posterior, así como a la técnica anterior citada en el presente documento, tal como, p. ej., la que se describe en el documento WO 08/020079 (página 16).

50 Los "dominios V_{HH} ", también conocidos como VHH, dominios V_{HH} , fragmentos de anticuerpo VHH y anticuerpos VHH, se describieron originalmente como el dominio de inmunoglobulina (variable) de unión a antígenos de "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, de "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman *et al.* 1993 Nature 363: 446-448). El término "dominio V_{HH} " ha sido elegido para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de la cadena pesada que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominan en el presente documento "dominios V_H " o "dominios VH ") y de los dominios variables de la cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominan en el presente documento "dominios V_L " o "dominios VL "). Para una descripción adicional de VHH y Nanobodies, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans (Reviews in Molecular Biotechnology 74:
55 277-302, 2001), así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como la técnica anterior general: WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Universidad Libre de Bruselas; 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; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Instituto Flamenco de Biotecnología (VIB, por sus siglas en neerlandés); WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; WO
60 01/90190 del Consejo Nacional de Investigación de Canadá; WO 03/025020 (= EP 1433793) del Instituto de

Anticuerpos, así como WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825, de Ablynx N.V. y las solicitudes de patente publicadas posteriormente por Ablynx N.V. También se hace referencia a la técnica anterior adicional mencionada en estas solicitudes y, en particular, la lista de referencias mencionadas en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153. Como se describe en estas referencias, los Nanobodies (en particular secuencias VHH y Nanobodies parcialmente humanizados) pueden caracterizarse, en particular, por la presencia de uno o más "residuos distintivos" en una o más de las secuencias de armazón. Una descripción adicional de los Nanobodies, incluida la humanización y/o camelización de Nanobodies, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o "fusiones de Nanobody", constructos multivalentes (incluidos algunos ejemplos no limitantes de secuencias conectoras) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los Nanobodies y sus preparados pueden encontrarse, p. ej., en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164. Para una descripción general adicional de Nanobodies, se hace referencia a la técnica anterior citada en el presente documento, tal como, p. ej., descrita en el documento WO 08/020079 (página 16).

En particular, las secuencias de armazón presentes en las moléculas que se unen a ADAMTS5 de la invención, tales como los ISVD y/o polipéptidos de la invención, pueden contener uno o más de los residuos distintivos (por ejemplo, como se describe en el documento WO 08/020079 (Tablas A-3 a A-8)), de tal manera que la molécula que se une a ADAMTS5 de la invención es un Nanobody. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de (combinaciones adecuadas de) tales secuencias de armazón quedarán claros a partir de la divulgación posterior en el presente documento (véase, p. ej., la Tabla A-2). En general, los Nanobodies (en particular las secuencias V_{HH} y los Nanobodies parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más "residuos distintivos" en una o más de las secuencias de armazón (como, p. ej., se describe más detalladamente en el documento WO 08/020079, de la página 61, línea 24 a la página 98, línea 3).

Más en particular, la divulgación proporciona moléculas que se unen a ADAMTS5 que comprenden al menos un dominio variable único de inmunoglobulina que es una secuencia de aminoácidos con la estructura (general)

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

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

i) tienen al menos un 80 %, más preferentemente un 90 %, incluso más preferentemente un 95 % de identidad de aminoácidos con al menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:s 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 o 18 (véase la Tabla A-1), en las que a efectos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, se ignoran los residuos aminoácidos que forman las secuencias CDR. A este respecto, también se hace referencia a la Tabla A-2, que enumera las secuencias de armazón 1 (SEQ ID NOs: 72-84), secuencias de armazón 2 (SEQ ID NOs: 85-94), secuencias de armazón 3 (SEQ ID NOs: 95-113) y las secuencias de armazón 4 (SEQ ID NOs: 114-115) de los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las SEQ ID NOs: 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18; o

ii) combinaciones de secuencias de armazón como se muestra en la Tabla A-2;

y en las que:

iii) preferentemente uno o más de los residuos aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos, tal como se menciona en la Tabla A-3 a la Tabla A-8 del documento WO 08/020079.

Las moléculas que se unen a ADAMTS5 de la divulgación también pueden contener las mutaciones/residuos aminoácidos específicos descritos en las siguientes solicitudes provisionales pendientes de resolución de EE. UU., todas ellas tituladas "Dominios variables mejorados de inmunoglobulina": US 61/994552 presentada el 16 de mayo de 2014; US 61/014,015 presentada el 18 de junio de 2014; US 62/040,167 presentada el 21 de agosto de 2014; y US 62/047 560, presentada el 8 de septiembre de 2014 (todas adjudicadas a Ablynx N.V.).

En particular, las moléculas que se unen a ADAMTS5 de la divulgación, tales como los ISVD y/o polipéptidos de la invención, pueden contener adecuadamente (i) una K o Q en la posición 112; o (ii) una K o Q en la posición 110 en combinación con una V en la posición 11; o (iii) una T en la posición 89; o (iv) una L en la posición 89 con una K o Q en la posición 110; o (v) una V en la posición 11 y una L en la posición 89; o cualquier combinación adecuada de (i) a (v).

Como también se describe en dichas solicitudes provisionales pendientes de resolución de EE. UU., cuando la molécula que se une a ADAMTS5 de la divulgación, tal como el ISVD y/o el polipéptido de la invención, contenga las mutaciones de acuerdo con uno de (i) a (v) anteriores (o una combinación adecuada de estos):

- el residuo aminoacídico en la posición 11 se elige preferentemente entre L, V o K (y es de la manera más preferente V); y/o

- el residuo aminoacídico en la posición 14 se elige preferente y adecuadamente entre A o P; y/o

- el residuo aminoacídico en la posición 41 se elige preferente y adecuadamente entre A o P; y/o

• el residuo aminoacídico en la posición 89 se elige preferente y adecuadamente entre T, V o L; y/o

- el residuo aminoacídico en la posición 108 se elige preferente y adecuadamente entre Q o L; y/o

- el residuo aminoacídico en la posición 110 se elige preferente y adecuadamente entre T, K o Q; y/o

- el residuo aminoacídico en la posición 112 se elige preferente y adecuadamente entre S, K o Q.

Como se mencionó en dichas solicitudes provisionales pendientes de resolución de EE. UU., dichas mutaciones son eficaces para prevenir o reducir la unión de los denominados "anticuerpos preexistentes" a las inmunoglobulinas y compuestos de la invención. A tal efecto, los aglutinantes ADAMTS5 de la invención, tales como los ISVD y/o polipéptidos de la invención, también pueden contener una extensión C-terminal (X)_n (en la que n es de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferentemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo aminoacídico (preferentemente de origen natural) que se elige de forma independiente, y preferentemente se elige de forma independiente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I)), véanse, p. ej., las solicitudes provisionales de EE. UU. así como el documento WO 12/175741. En particular, una molécula que se une a ADAMTS5 de la invención, tal como un ISVD y/o polipéptido de la invención, puede contener tal extensión C-terminal cuando forma el extremo C-terminal de una proteína, polipéptido u otro compuesto o constructo que lo comprende (véanse, p. ej., dichas solicitudes provisionales de EE. UU. así como el documento WO 12/175741).

Una molécula que se une a ADAMTS5 de la invención puede ser una inmunoglobulina, tal como un dominio variable único de inmunoglobulina, obtenido de cualquier manera adecuada y de cualquier fuente adecuada, y puede ser, por ejemplo, secuencias VHH de origen natural (es decir, de una especie adecuada de camélidos) o secuencias de aminoácidos sintéticos o semisintéticos, incluidas, entre otras, secuencias de Nanobodies o VHH "humanizadas" (según se define en el presente documento), secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (según se define en el presente documento) (y en particular secuencias de dominio variable de la cadena pesada camelizadas), así como Nanobodies que se han obtenido mediante técnicas tales como la maduración de la afinidad (por ejemplo, a partir de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o de origen natural), injerto de CDR, rechapado, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje de PCR utilizando cebadores solapantes y técnicas similares para la modificación de secuencias de inmunoglobulinas muy conocidas por el experto; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de los anteriores como se describe en el presente documento en más detalle. Además, cuando una inmunoglobulina comprende una secuencia VHH, dicha inmunoglobulina puede humanizarse adecuadamente, como se describe en más detalle en el presente documento, para proporcionar una o más inmunoglobulinas humanizadas (parcial o totalmente) adicionalmente de la invención. Del mismo modo, cuando una inmunoglobulina comprende una secuencia sintética o semisintética (tal como una secuencia parcialmente humanizada), dicha inmunoglobulina puede opcionalmente humanizarse más convenientemente, de nuevo como se describe en el presente documento, de nuevo para proporcionar una o más inmunoglobulinas humanizadas (parcial o totalmente) adicionalmente de la invención.

"Anticuerpos de dominio", también conocidos como "Dab", "anticuerpos de dominio" y "dAbs" (utilizándose los términos "anticuerpos de dominio" y "dAbs" como marcas comerciales registradas por el grupo de empresas GlaxoSmithKline) se han descrito en, p. ej., el documento EP 0368684, Ward *et al.* (Nature 341: 544-546, 1989), Holt *et al.* (Trends in Biotechnology 21: 484-490, 2003) y el documento WO 03/002609, así como, por ejemplo, los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. Los anticuerpos de dominio corresponden esencialmente a los dominios VH o VL de mamíferos no camélidos, en particular los anticuerpos de 4 cadenas humanos. Con el fin de unirse a un epítipo como un dominio de unión a antígeno único, es decir, sin estar emparejado con un dominio VL o VH, respectivamente, se requiere una selección específica de tales propiedades de unión de antígenos, p. ej., mediante el uso de colecciones de secuencias humanas de dominio VH o VL único. Los anticuerpos de dominio tienen, como los VHH, un peso molecular de aproximadamente 13 a aproximadamente 16 kDa y, si se obtienen de secuencias totalmente humanas, no requieren humanización para, p. ej., su uso terapéutico en seres humanos.

Cabe señalar también que, aunque es menos preferido en el contexto de la presente divulgación por que no tienen su origen en mamíferos, los dominios variables únicos pueden obtenerse de determinadas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados "dominios IgNAR", véase, por ejemplo, el documento WO 05/18629).

La presente invención se refiere particularmente a los ISVD, en donde dichos ISVD se eligen del grupo que consiste en VHH, VHH humanizados y VHS camelizados.

Los residuos aminoacídicos de un dominio V_H se numeran de acuerdo con la numeración general para dominios V_H dada por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", Servicios de Sanidad Pública de EE. UU., NIH Bethesda, MD, Publicación N.º 91), según se aplica a los dominios VHH de camélidos, como se muestra, p. ej., en la Figura 2 de Riechmann y Muyldermans (J. Immunol. Methods 231: 25-38, 1999), todo como se conoce en la técnica. En la técnica también se conocen métodos alternativos para numerar los residuos aminoacídicos de los dominios V_H, métodos que también se pueden aplicar de manera análoga a los dominios VHH. Sin embargo, en la presente descripción, reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración según Kabat aplicada a los dominios VHH descritos anteriormente, a menos que se indique otra cosa.

Cabe señalar que, como es bien sabido en la técnica para los dominios V_H y para los dominios VHH, el número total de residuos aminoacídicos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos aminoacídicos 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 aminoacídicos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, generalmente, la numeración según Kabat puede o no corresponder a la numeración real de los residuos aminoacídicos en la secuencia real. El número total de residuos aminoacídicos en un dominio V_H y un dominio VHH generalmente estará en el intervalo de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. Sin embargo, cabe señalar que las secuencias más pequeñas y más largas también pueden ser adecuadas para los fines descritos en el presente documento.

Con respecto a las CDR, como es bien sabido en la técnica, existen múltiples convenciones para definir y describir las CDR de un fragmento V_H o VHH, tales como la definición de Kabat (que se basa en la variabilidad de la secuencia y es la utilizada con más frecuencia) y la definición de Chothia (que se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales). Se hace referencia, por ejemplo, al sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>. A los efectos de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, las CDR se definen más preferentemente basándose en la definición de Abm (que se basa en el software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular), ya que se considera que esto es un término medio óptimo entre las definiciones de Kabat y Chothia (consulte <http://www.bioinf.org.uk/abs/>). Tal como se usa en el presente documento, FR1 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 1-25, CDR1 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 26-35, FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 50-58, FR3 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 59-94, CDR3 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 95-102, y FR4 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 103-113.

En el sentido de la presente invención, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" o "dominio variable único" comprende polipéptidos que se obtienen de una fuente no humana, preferentemente un camélido, preferentemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Pueden humanizarse, como se describe en el presente documento. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes que no son camélidos, p. ej., ratón o ser humano, que se han "camelizado", como se describe en el presente documento.

Por lo tanto, los ISVD tales como los anticuerpos de dominio y Nanobodies (incluidos dominios VHH) pueden ser sometidos a humanización. En particular, los ISVD humanizados, tales como Nanobodies (incluidos dominios VHH) pueden ser ISVD que son como se definen generalmente en el presente documento, pero en los que al menos un residuo aminoacídico está presente (y en particular, en al menos uno de los residuos de armazón) que es y/o que corresponde a una sustitución humanizante (como se define en el presente documento). Las sustituciones humanizantes potencialmente útiles pueden determinarse comparando la secuencia de las regiones de armazón de una secuencia V_{HH} de origen natural con la secuencia de armazón correspondiente de una o más secuencias V_H humanas estrechamente relacionadas, después de lo cual una o más de las sustituciones humanizantes potencialmente útiles (o combinaciones de estas) determinadas de esta manera pueden introducirse en dicha secuencia V_{HH} (de cualquier manera conocida *per se*, como se describe más adelante en el presente documento) y se puede estudiar la afinidad por la diana, la estabilidad, la facilidad y el nivel de expresión, y/u otras propiedades deseadas de las secuencias V_{HH} humanizadas resultantes. De esta manera, por medio de un grado limitado de ensayo y error, el experto puede determinar otras sustituciones humanizantes adecuadas (o combinaciones adecuadas de estas) basándose en la divulgación del presente documento. Además, basándose en lo anterior, (las regiones de armazón de) un ISVD, como un Nanobody (incluidos los dominios VHH) pueden estar parcialmente humanizados o totalmente humanizados.

Otra clase particularmente preferida de ISVD comprende ISVD con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural, pero que ha sido "camelizado", es decir, reemplazando uno o más residuos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos aminoacídicos que se producen en la posición o posiciones correspondientes en un dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada. Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que será evidente para el experto, por ejemplo, basándose

en la descripción del presente documento. Tales sustituciones "camelizantes" se insertan preferentemente en las posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfaz V_H - V_L , y/o en los denominados residuos distintivos de camélidos, como se definen en el presente documento (véanse también, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). Preferentemente, la secuencia V_H que se utiliza como material de partida o punto de partida para generar o diseñar los dominios variables únicos de inmunoglobulina camelizados es preferentemente una secuencia V_H de un mamífero, más preferentemente la secuencia V_H de un ser humano, tal como una secuencia V_{H3} . Sin embargo, cabe señalar que tales dominios variables únicos de inmunoglobulina camelizados de la invención pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida *per se* y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio V_H de origen natural como material de partida. Se hace referencia a Davies y Riechmann (FEBS 339: 285-290, 1994; Biotechnol. 13: 475-479, 1995; Prot. Eng. 9: 531-537, 1996) y Riechmann y Muyldermans (J. Immunol. Methods 231: 25-38, 1999)

Por ejemplo, de nuevo como se describe en más detalle en el presente documento, tanto la "humanización" como la "camelización" pueden realizarse proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_{HH} o un dominio V_H , respectivamente, de origen natural y después cambiando, de una manera conocida *per se*, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de tal manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifique un ISVD "humanizado" o "camelizado" de la invención, respectivamente. Este ácido nucleico puede entonces expresarse de una manera conocida *per se*, de manera que proporcione los ISVD de la invención deseados. Como alternativa, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} o dominio V_H , respectivamente, de origen natural, la secuencia de aminoácidos de los ISVD humanizados o camelizados, respectivamente, deseados de la invención puede diseñarse y luego sintetizarse *de novo* utilizando técnicas de síntesis de péptidos conocidas *per se*. Además, basándose en la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un dominio V_{HH} o dominio V_H , respectivamente, de origen natural se puede diseñar una secuencia de nucleótidos que codifica los ISVD humanizados o camelizados, respectivamente, deseados de la invención y después sintetizarla *de novo* utilizando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos conocidas *per se*, después de lo cual el ácido nucleico obtenido de esta manera puede expresarse de una manera conocida *per se*, con el fin de proporcionar los ISVD deseados de la invención.

Los ISVD tales como los anticuerpos de dominio y Nanobodies (incluidos los dominios V_{HH} y dominios V_{HH} humanizados), también se pueden someter a la maduración de la afinidad introduciendo una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de una o más CDR, donde estas alteraciones dan como resultado una mejora de la afinidad de los ISVD resultantes por su antígeno respectivo, en comparación con la molécula precursora respectiva. Las moléculas ISVD con maduración de la afinidad de la invención pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.* (Biotechnology 10:779-783, 1992), Barbas *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813, 1994), Shier *et al.* (Gene 169: 147-155, 1995), Yelton *et al.* (Immunol. 155: 1994-2004, 1995), Jackson *et al.* (J. Immunol. 154: 3310-9, 1995), Hawkins *et al.* (J. Mol. Biol. 226: 889 896, 1992), Johnson y Hawkins (Affinity maturation of antibodies using phage display, Oxford University Press, 1996).

El proceso de diseñar/seleccionar y/o preparar un polipéptido, a partir de un ISVD tal como un, V_H , V_L , V_{HH} , anticuerpo de dominio o un Nanobody, también se denomina en el presente documento "formateo" de dicho ISVD; y un ISVD que se hace parte de un polipéptido se dice que está "formateado" o que está "en el formato de" dicho polipéptido. Para el experto serán evidentes ejemplos de maneras en las que un ISVD puede estar formateado y ejemplos de tales formatos basándose en la divulgación del presente documento; y tal dominio variable único de inmunoglobulina formateado forma un aspecto adicional de la invención.

Las CDR preferidas se muestran en la Tabla A-2.

En un aspecto particular preferido, la presente invención se refiere a un ISVD como se reivindica en el presente documento, en donde dicho ISVD se une específicamente a ADAMTS5 y consiste esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que CDR1 es o comprende la SEQ ID NO: 21, CDR2 es la SEQ ID NO: 37 y CDR3 es la SEQ ID NO: 55.

En particular, la presente invención se refiere a un ISVD como se reivindica en el presente documento, en donde dicho ISVD se une específicamente a ADAMTS5 y consiste esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que dicho ISVD es la SEQ ID NO: 2.

Se apreciará que, sin limitación, los dominios variables únicos de inmunoglobulina de la presente invención pueden utilizarse como un "componente básico" para la preparación de un polipéptido, que puede contener opcionalmente uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina adicionales que pueden servir como un componente básico (es decir, contra el mismo u otro epítipo en ADAMTS5 y/o contra uno o más antígenos, proteínas o dianas que no son ADAMTS5).

El polipéptido de la invención (también indicado en el presente documento como "constructo Nanobody") comprende al menos un ISVD que se une a ADAMTS5, tal como dos ISVD que se unen a ADAMTS5, y preferentemente también un ISVD que se une a albúmina. En un polipéptido de la invención, los ISVD pueden estar conectados directamente o conectados mediante un conector. Aún más preferentemente, el polipéptido de la invención comprende una extensión C-terminal. Como se detallará en el presente documento, la extensión C-terminal esencialmente evita/elimina la unión de anticuerpos/factores preexistentes en la mayoría de las muestras de sujetos/pacientes humanos. La extensión C-terminal está presente en posición C-terminal respecto al último residuo aminoacídico (generalmente un residuo de serina) del último (ubicado en la posición más C-terminal) ISVD.

Como se explica en más detalle más adelante, los ISVD pueden obtenerse de un dominio V_{HH} , V_H o V_L , sin embargo, los ISVD se eligen de tal manera que no formen pares complementarios de los dominios V_H y V_L en los polipéptidos de la invención. El Nanobody, V_{HH} y V_{HH} humanizado son inusuales en el sentido de que se obtienen de anticuerpos naturales de camélidos que no tienen cadenas ligeras, y de hecho estos dominios son incapaces de asociarse con cadenas ligeras de camélidos para formar pares complementarios de V_{HH} y V_L . Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención no comprenden ISVD complementarios y/o forman pares de ISVD complementarios, tales como, por ejemplo, pares complementarios de V_H / V_L .

Generalmente, los polipéptidos o constructos que comprenden o consisten esencialmente en un único componente básico, ISVD único o Nanobody único se denominarán en el presente documento polipéptidos "monovalentes" y "constructos monovalentes", respectivamente. Los polipéptidos o constructos que comprenden dos o más componentes básicos (tales como, p. ej., ISVD) también se denominarán en el presente documento polipéptidos o constructos "multivalentes", y también se dirá en el presente documento que los componentes básicos/ISVD presentes en dichos polipéptidos o constructos están en un "formato multivalente". Por ejemplo, un polipéptido "bivalente" puede comprender dos ISVD, opcionalmente conectados a través de una secuencia conectora, mientras que un polipéptido "trivalente" puede comprender tres ISVD, opcionalmente conectados a través de dos secuencias conectoras; mientras que un polipéptido "tetraivalente" puede comprender cuatro ISVD, opcionalmente conectados a través de tres secuencias conectoras, etc.

En un polipéptido multivalente, los dos o más ISVD pueden ser iguales o diferentes, y pueden estar dirigidos contra el mismo antígeno o determinante antigénico (por ejemplo, contra la(s) misma(s) parte(s) o epítipo(s) o contra diferentes partes o epítopos) o, como alternativa, pueden ser dirigidos contra diferentes antígenos o determinantes antigénicos; o cualquier combinación adecuada de estos. Los polipéptidos y constructos que contengan al menos dos componentes básicos (tales como, p. ej., ISVD) en los que al menos un componente básico está dirigido contra un primer antígeno (es decir, ADAMTS5) y al menos un componente básico está dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de ADAMTS5) también se denominarán polipéptidos y constructos "multiespecíficos", y también se dirá en el presente documento que los componentes básicos (tales como, p. ej., ISVD) presentes en tales polipéptidos y constructos están en un "formato multiespecífico". Por lo tanto, por ejemplo, un polipéptido "biespecífico" de la invención es un polipéptido que comprende al menos un ISVD dirigido contra un primer antígeno (es decir, ADAMTS5) y al menos un ISVD adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente de ADAMTS5), mientras que un polipéptido "trisespecífico" de la invención es un polipéptido que comprende al menos un ISVD dirigido contra un primer antígeno (es decir, ADAMTS5), al menos un ISVD adicional dirigida contra un segundo antígeno (es decir, diferente de ADAMTS5) y al menos un ISVD adicional dirigido contra un tercer antígeno (es decir, diferente de ADAMTS5 y el segundo antígeno); etc.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos 2 ISVD, en donde al menos 1 ISVD se une específicamente a ADAMTS5, más preferentemente la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica que comprende al menos 2 ISVD, en donde dichos al menos 2 ISVD se unen específicamente a ADAMTS5, más preferentemente cada ISVD de dichos 2 ISVD se elige independientemente del grupo que consiste en las SEQ ID NO:s 2, 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18.

Los polipéptidos "multiparatópicos" y los constructos "multiparatópicos", tales como, p. ej., los polipéptidos o constructos "biparatópicos" y los polipéptidos o constructos "triparatópicos", comprenden o consisten esencialmente en dos o más componentes básicos que tienen cada uno un paratopo diferente.

En consecuencia, los ISVDs de la invención que se unen a ADAMTS5 pueden estar en forma esencialmente aislada (como se define en el presente documento), o pueden formar parte de un constructo o polipéptido, que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más ISVD que se unen a ADAMTS5 y que opcionalmente pueden comprender además una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todos opcionalmente conectados a través de uno o más conectores adecuados). La presente invención se refiere a un polipéptido o constructo que comprende o consiste esencialmente en al menos un ISVD de acuerdo con la invención, tal como uno o más ISVD de la invención (o fragmentos adecuados de estos), que se unen a ADAMTS5.

El uno o más ISVD de la invención pueden utilizarse como componentes básicos en dicho polipéptido o constructo, a fin de proporcionar un polipéptido o constructo monovalente, multivalente o multiparatópico de la invención, respectivamente, todo como se describe en el presente documento. La presente invención, por lo tanto, también se refiere a un polipéptido que es un constructo monovalente que comprende o consiste esencialmente en un ISVD o polipéptido monovalente de la invención.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un polipéptido o constructo que es un polipéptido multivalente o constructo multivalente, respectivamente, tal como, p. ej., un polipéptido o constructo bivalente o trivalente que comprende o consiste esencialmente en dos o más ISVD de la invención (para polipéptidos multivalentes y multispecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al.* (J. Biol. Chem. 276: 7346-7350, 2001), así como, por ejemplo, a los documentos WO 96/34103, WO 99/23221 y WO 2010/115998).

En un aspecto, en su forma más simple, el polipéptido o constructo multivalente de la invención es un polipéptido o constructo bivalente de la invención que comprende un primer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra ADAMTS5, y un segundo ISVD idéntico, tal como un Nanobody, dirigido contra ADAMTS5, en donde dicho primer y dicho segundo ISVD, tales como Nanobodies, pueden estar conectados opcionalmente mediante una secuencia conectora (como se define en el presente documento). En otra forma, un polipéptido o constructo multivalente de la invención puede ser un polipéptido o constructo trivalente de la invención, que comprende un primer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra ADAMTS5, un segundo ISVD idéntico, tal como un Nanobody, dirigido contra ADAMTS5, y un tercer ISVD idéntico, tal como un Nanobody, dirigido contra ADAMTS5, en el que dicho primer, segundo y tercer ISVD, tales como Nanobodies, pueden estar conectados opcionalmente mediante uno o más, y en particular dos, secuencias conectoras. En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido o constructo que comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD de acuerdo con la invención, tales como 2, 3 o 4 ISVD (o fragmentos adecuados de estos), que se unen a ADAMTS5. Los dos o más ISVD pueden conectarse opcionalmente a través de uno o más conectores peptídicos.

En otro aspecto, el polipéptido o constructo multivalente de la invención puede ser un polipéptido o constructo biespecífico de la invención, que comprende un primer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra ADAMTS5, y un segundo ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra un segundo antígeno, tal como, por ejemplo, agregano, en el que dicho primer y segundo ISVD, tales como Nanobodies, pueden estar conectados opcionalmente a través de una secuencia conectora (como se define en el presente documento); mientras que un polipéptido o constructo multivalente de la invención también puede ser un polipéptido o constructo trisespecífico de la invención, que comprende un primer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra ADAMTS5, un segundo ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra un segundo antígeno, tal como, por ejemplo, agregano, y un tercer ISVD, tal como un Nanobody, dirigido contra un tercer antígeno, en el que dicho primer, segundo y tercer ISVD, tales como Nanobodies, pueden estar conectados opcionalmente a través de uno o más, y en particular dos, secuencias conectoras.

La invención se refiere además a un polipéptido multivalente que comprende o consiste (esencialmente) en al menos un ISVD (o fragmentos adecuados de este) que se une a ADAMTS5, preferentemente ADAMTS5 humana, y un ISVD adicional, tal como un ISVD que se une a agregano.

Los polipéptidos o constructos bivalentes, biespecíficos son los que se muestran en los Ejemplos descritos en el presente documento y en la Tabla A-1 (consulte las SEQ ID NO:s 120-130 (es decir, las SEQ ID NO: 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 y 130), de la manera más preferente las SEQ ID NO:s 129 y 130. Los polipéptidos bivalentes, biespecíficos especialmente preferidos incluyen las SEQ ID NO:s 122, 126, 129 y 130.

En un aspecto preferido, el polipéptido o constructo de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD, en donde dichos al menos dos ISVD pueden ser iguales o diferentes, pero de los cuales al menos un ISVD está dirigido contra ADAMTS5, preferentemente dicho ISVD que se une a ADAMTS5 es la SEQ ID NO: 2.

Los dos o más ISVD presentes en el polipéptido o constructo multivalente de la invención pueden consistir en una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (p. ej., una secuencia V_L) o en una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (p. ej., una secuencia V_H); pueden consistir en una secuencia de dominio variable de la cadena pesada que se obtiene de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o en una secuencia de dominio variable de la cadena pesada que se obtiene de un anticuerpo de cadena pesada. En un aspecto preferido, consisten en un anticuerpo de dominio (o un aminoácido que es adecuado para su uso como un anticuerpo de dominio), en un anticuerpo de dominio único (o un aminoácido que es adecuado para su uso como un anticuerpo de dominio único), en un "dAb" (o un aminoácido que es adecuado para su uso como un dAb), en un Nanobody® (incluido, entre otros, un V_{HH}), en una secuencia V_{HH} humanizada, en una secuencia V_H camelizada; o en una secuencia V_{HH} obtenida por maduración de la afinidad. Los dos o más dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden consistir en un Nanobody parcial o totalmente humanizado o un VHH parcial o totalmente humanizado.

En un aspecto de la invención, el primer ISVD y el segundo ISVD presentes en el polipéptido o constructo multiparatópico (preferentemente biparatópico o triparatópico) de la invención no compiten (de manera cruzada) entre sí por la unión a ADAMTS5 y, como tales, pertenecen a diferentes familias. En consecuencia, la presente invención se refiere a un polipéptido o constructo multiparatópico (preferentemente biparatópico) que comprende dos o más ISVD en donde cada ISVD pertenece a una familia diferente. En un aspecto, el primer ISVD de este polipéptido o constructo multiparatópico (preferentemente biparatópico) de la invención no bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 del segundo ISVD de este polipéptido o constructo multiparatópico (preferentemente biparatópico) de la invención y/o el segundo ISVD no bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 del primer ISVD. En otro aspecto, el primer ISVD de un polipéptido o constructo multiparatópico (preferentemente biparatópico) de la invención bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 del segundo ISVD de este polipéptido o constructo multiparatópico (preferentemente biparatópico) de la invención y/o el segundo ISVD bloquea de manera cruzada la unión a ADAMTS5 del primer ISVD.

En un aspecto particularmente preferido, el polipéptido o constructo de la invención comprende o consiste esencialmente en tres o más ISVD, de los cuales al menos dos ISVD están dirigidos contra ADAMTS5. Se apreciará que dichos al menos dos ISVD dirigidos contra ADAMTS5 pueden ser iguales o diferentes, pueden estar dirigidos contra el mismo epítipo o epítopos diferentes de ADAMTS5, pueden pertenecer a la misma agrupación epitópica (*epitope bin*) o a diferentes grupos epitópicos, y/o pueden unirse a los mismos o diferentes dominios de ADAMTS5.

Las afinidades relativas pueden depender de la ubicación de los ISVD en el polipéptido. Se apreciará que el orden de los ISVD en un polipéptido de la invención (orientación) se puede elegir de acuerdo a las necesidades del experto. El orden de los ISVD individuales, así como si el polipéptido comprende un conector es una cuestión de elección de diseño. Algunas orientaciones, con o sin conectores, pueden proporcionar características de unión preferidas en comparación con otras orientaciones. Por ejemplo, el orden de un primer ISVD (p. ej., ISVD 1) y un segundo ISVD (p. ej., ISVD 2) en el polipéptido de la invención puede ser (del extremo N al extremo C): i) ISVD 1 (p. ej., Nanobody 1) - [conector] - ISVD 2 (p. ej., Nanobody 2) - [extensión C-terminal]; o ii) ISVD 2 (p. ej., Nanobody 2) - [conector] - ISVD 1 (p. ej., Nanobody 1) - [extensión C-terminal]; (en donde los restos entre corchetes cuadrados, es decir, el conector y la extensión C-terminal, son opcionales). Todas las orientaciones están abarcadas por la invención. Los polipéptidos que contienen una orientación de ISVD que proporciona las características de unión deseadas pueden identificarse fácilmente mediante el cribado de rutina, por ejemplo, como se ejemplifica en la sección de ejemplos. Un orden preferido es del extremo N al extremo C: ISVD que se une a ADAMTS5 - [conector]- ISVD que se une a albúmina o agregano - [extensión C-terminal], en donde los restos entre los corchetes son opcionales.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende dos o más ISVD que se unen específicamente a ADAMTS5, en donde

a) al menos un "primer" ISVD se une específicamente a un primer determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o conformación de ADAMTS5, preferentemente dicho "primer" ISVD que se une específicamente a ADAMTS5 es la SEQ ID NO: 2; y

b) al menos un "segundo" ISVD se une específicamente a un segundo determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o conformación de ADAMTS5, diferente del primer determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o conformación, respectivamente, preferentemente dicho "segundo" ISVD que se une específicamente a ADAMTS5 es la SEQ ID NO: 116 o 19.

En un aspecto preferido, el polipéptido o constructo de la invención comprende o consiste esencialmente en al menos dos ISVD que se unen a ADAMTS5, en donde dichos al menos dos ISVD pueden ser iguales o diferentes, los cuales se eligen independientemente del grupo que consiste en las SEQ ID NO:s 2, 116, 19, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido o constructo multiparatópico (preferentemente biparatópico) que comprende dos o más ISVD dirigidos contra ADAMTS5 que unen al mismo epítipo o epítopos a los que se unen cualquiera de las SEQ ID NO:s 2, 1, 3, 6, 16, 17, 10, 11, 9, 5, 4, 7, 117, 8, 12, 13, 14, 15 y 18.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de un 100 % con las SEQ ID NO:s 2, 122, 126, 129 o 130.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido como se describe en el presente documento, que se elige del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 127 (clon 130 049-093-Alb), SEQ ID NO: 126 (clon 129 2F3-093-Alb), SEQ ID NO: 127 (clon 130 049-093-Alb) y SEQ ID NO: 128 (clon 131 9D3-093-Alb).

En la técnica se necesitan terapias más eficaces para los trastornos que afectan al cartílago en las articulaciones, tales como la osteoartritis. Especialmente cuando se administran sistemáticamente, el tiempo de permanencia de

la mayoría de los fármacos es insuficiente. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la eficacia de un fármaco terapéutico, tal como un constructo, polipéptido e ISVD de la invención, podría incrementarse significativamente acoplando el fármaco terapéutico a un resto que prolongue la semivida del fármaco y, en consecuencia, aumente la retención del fármaco, pero que no debe alterar la eficacia de dicho fármaco terapéutico.

En un aspecto específico de la invención, un constructo o polipéptido de la invención puede tener un resto que confiera una mayor semivida, en comparación con el constructo o polipéptido correspondiente de la invención sin dicho resto. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de tales constructos y polipéptidos de la invención quedarán claros para el experto basándose en la divulgación posterior en el presente documento, y, por ejemplo, comprenden ISVD o polipéptidos de la invención que han sido modificados químicamente para aumentar su semivida (por ejemplo, mediante pegilación); las moléculas que se unen a ADAMTS5 de la invención, tales como los ISVD y/o los polipéptidos de la invención que comprenden al menos un sitio de unión adicional para unirse a una proteína sérica (tal como la albúmina sérica); o los polipéptidos de la invención que comprenden al menos un ISVD de la invención que se une a al menos un resto (y en particular al menos una secuencia de aminoácidos) que prolonga la semivida de la secuencia de aminoácidos de la invención. Los ejemplos de constructos de la invención, tales como polipéptidos de la invención, que comprenden dichos restos que prolongan la semivida o ISVD serán evidentes para el experto a partir de la divulgación posterior en el presente documento; y por ejemplo, incluyen, sin limitación, polipéptidos en los que uno o más ISVD de la invención están convenientemente conectados a una o más proteínas séricas o fragmentos de estas (tales como albúmina sérica (humana) o fragmentos adecuados de esta) o a una o más unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas (tales como, por ejemplo, anticuerpos de dominio, dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como un anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio único, dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como un anticuerpo de dominio único, dAbs, dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como dAb, o Nanobodies que pueden unirse a proteínas séricas tales como la albúmina sérica (tal como albúmina sérica humana), inmunoglobulinas séricas tales como IgG, o transferrina; se hace referencia a la descripción adicional y referencias mencionadas en el presente documento); polipéptidos en los que una secuencia de aminoácidos de la invención está conectada a una porción Fc (tal como un Fc humano) o una parte o fragmento adecuados de esta; o polipéptidos en los que el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina de la invención están convenientemente conectados a una o más proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas, tales como, sin limitación, las proteínas y péptidos descritos en los documentos WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489, WO2008/068280, WO2009/127691 y PCT/EP2011/051559.

En un aspecto, la presente invención proporciona un constructo de la invención o un polipéptido, en donde dicho constructo o dicho polipéptido comprende además una proteína sérica o un resto que se une a una proteína sérica. Preferentemente, dicho resto que se une a una proteína sérica se une a la albúmina sérica, tal como la albúmina sérica humana.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende un ISVD que se une a albúmina sérica.

Generalmente, los constructos o polipéptidos de la invención con prolongación de la semivida tienen preferentemente una semivida que es al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces o más de 20 veces, más prolongada que la semivida de los constructos o polipéptidos correspondientes de la invención *per se*, es decir, sin el resto que confiere la prolongación de la semivida. Por ejemplo, los constructos o polipéptidos de la invención con una prolongación de la semivida pueden tener una semivida, p. ej., en seres humanos que se prolonga en más de 1 hora, preferentemente más de 2 horas, más preferentemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con los constructos o polipéptidos correspondientes de la invención *per se*, es decir, sin el resto que confiere la prolongación de la semivida.

En un aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, los constructos de la invención y los polipéptidos de la invención tienen una semivida sérica, p. ej., en los seres humanos que se prolonga en más de 1 hora, preferentemente más de 2 horas, más preferentemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con los correspondientes constructos o polipéptidos de la invención *per se*, es decir, sin el resto que confiere la prolongación de la semivida.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, tales constructos de la invención, tales como los polipéptidos de la invención, muestran una semivida sérica en seres humanos de al menos 12 horas, preferentemente al menos 24 horas, más preferentemente al menos 48 horas, incluso más preferentemente al menos 72 horas o más. Por ejemplo, los constructos o polipéptidos de la invención pueden tener una semivida de al menos 5 días (tal como aproximadamente de 5 a 10 días), preferentemente al menos 9 días (tal como aproximadamente de 9 a 14 días), más preferentemente al menos aproximadamente 10 días (tal como aproximadamente de 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente de 11 a 16

días), más preferentemente al menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente de 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente de 14 a 19 días).

En un aspecto particularmente preferido pero no limitante de la invención, la invención proporciona un constructo de la invención y un polipéptido de la invención, que comprende además el uno o más componentes básicos que se unen a ADAMTS5 al menos un componente básico que se une a albúmina sérica, tal como un ISVD que se une a albúmina sérica, tal como albúmina sérica humana como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicho ISVD que se une a albúmina sérica comprende o consiste esencialmente en 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las cuales CDR1 es SFGMS, CDR2 es SISGSGSDTLYADSVKG y CDR3 es GGSLSR. Preferentemente, dicho ISVD que se une a albúmina sérica humana se elige del grupo que consiste en Alb8, Alb23, Alb129, Alb132, Alb11, Alb11 (S112K)-A, Alb82, Alb82-A, Alb82-AA, Alb82-AAA, Alb82-G, Alb82-GG, Alb82-GGG, Alb92 o Alb223 (consulte la Tabla D).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende al menos un ISVD que se une a ADAMTS5 y un ISVD que se une a albúmina sérica, preferentemente elegidos del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 129 (clon 577 2F3*-Alb), SEQ ID NO: 130 (clon 579 2F3*-093-Alb), SEQ ID NO: 120 (clon 4 2A12-Alb), SEQ ID NO: 121 (clon 5 2D7-Alb), SEQ ID NO: 122 (clon 6 2F3-Alb), SEQ ID NO: 123 (clon 69 049-Alb), SEQ ID NO: 124 (clon 70 9D3-Alb), SEQ ID NO: 125 (clon 71 3B2-Alb), SEQ ID NO: 126 (clon 129 2F3-093-Alb), SEQ ID NO: 127 (clon 130 049-093-Alb) y SEQ ID NO: 128 (clon 131 9D3-093-Alb) (consulte la Tabla A-1).

En una realización, la presente invención se refiere al constructo de la invención, tal como un polipéptido que comprende un resto que se une a proteínas séricas, en donde dicho resto que se une a proteínas séricas es un polipéptido basado en moléculas que no son anticuerpos.

En la técnica se necesitan terapias más eficaces para los trastornos que afectan al cartílago en las articulaciones, tales como la osteoartritis. Incluso cuando se administran intra-articularmente, el tiempo de permanencia de la mayoría de los fármacos para tratar el cartílago afectado es insuficiente. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la eficacia de un fármaco terapéutico, tal como un constructo, polipéptido e ISVD de la invención, se puede modular acoplando el fármaco terapéutico a un resto que "anclaría" el fármaco a la articulación y, en consecuencia, aumentaría la retención del fármaco, pero que no debería alterar la eficacia de dicho fármaco terapéutico (este resto también se indica en el presente documento como "proteína de anclaje en cartílago" o "CAP", por sus siglas en inglés). Este concepto de anclaje podría no solo modular la eficacia de un fármaco, sino también la especificidad operacional para una articulación enferma al disminuir la toxicidad y los efectos secundarios, y ampliar así el número de posibles fármacos útiles.

Se anticipó que un formato de una molécula para uso clínico comprende uno o dos componentes básicos, tales como ISVD, que se unen a ADAMTS5 y uno o más componentes básicos, por ejemplo, ISVD, con tal modo de acción de retención, y posiblemente otros restos. En la solicitud pendiente de resolución se demuestra que tales formatos conservan tanto la unión a ADAMTS5 como un efecto terapéutico, p. ej., actividad inhibidora, así como propiedades de retención. El uno o más componentes básicos, tales como los ISVD, con un modo de acción de retención pueden ser cualquier componente básico que tenga un efecto de retención ("componente básico CAP") en enfermedades en las que está involucrada ADAMTS5, tales como enfermedad artrítica, osteoartritis, displasia espondiloepimetáfisaria, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones, artritis reumatoide, osteocondritis disecante, agrecanopatías.

Se utiliza un "componente básico CAP" para dirigir, anclar y/o retener otros componentes básicos, p. ej., terapéuticos, tales como ISVD que se unen a ADAMTS5 en un sitio deseado, tal como, p. ej., en una articulación, en la que dicho otro componente básico, p. ej., terapéutico, debe ejercer su efecto, p. ej., unirse a y/o inhibir ADAMTS5.

Los presentes inventores plantearon además la hipótesis de que las moléculas que se unen a agrecano, tales como el ISVD o los ISVD que se unen a agrecano, podrían funcionar potencialmente como tal ancla, aunque el agrecano está muy glucosilado y degradado en varios trastornos que afectan al cartílago de las articulaciones. Además, en vista de los costos y las pruebas exhaustivas en varios modelos en animales requeridos antes de que un medicamento pueda entrar en el ámbito clínico, tales moléculas que se unen a agrecano deben tener preferentemente una amplia reactividad cruzada, p. ej., las moléculas que se unen a agrecano deben unirse a agrecano de varias especies.

Utilizando diversos métodos ingeniosos de inmunización, cribado y caracterización, los presentes inventores pudieron identificar varias moléculas de unión a agrecano con características superiores de selectividad, estabilidad y especificidad, lo que permitió una retención y actividad prolongadas en la articulación (consulte la solicitud pendiente de resolución).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir y/o inhibir la salida de una composición, un polipéptido o un constructo desde una articulación, en donde dicho método comprende administrar una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un polipéptido de acuerdo con la invención, un constructo de acuerdo con la invención o una composición de acuerdo con la invención a una persona que lo necesite.

En la presente invención, el término "reducir y/o inhibir la salida" significa reducir y/o inhibir el flujo hacia el exterior de la composición, polipéptido o constructo desde el interior de una articulación hacia el exterior. Preferentemente, la salida se reduce y/o inhibe en al menos un 10 %, tal como en al menos un 20 %, 30 %, 40 % o 50 % o incluso más, como en al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso un 100 %, en comparación con la salida de la composición, polipéptido o constructo mencionado anteriormente en una articulación en las mismas condiciones pero sin la presencia de la molécula que se une a agrecano de la invención, p. ej., el ISVD o los ISVD que se unen a agrecano.

Además de las enfermedades en las que está involucrada ADAMTS5, tales como la enfermedad artrítica, osteoartritis, displasia espondiloepimetáfisaria, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones, artritis reumatoide, osteocondritis disecante y agrecanopatías se anticipa que las moléculas que se unen a agrecano de la invención también se podrán utilizar en otras enfermedades diferentes que afectan al cartílago, tales como artropatías y condrodistrofias, enfermedades artríticas (tales como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis psoriásica, rotura o desprendimiento traumáticos), acondroplasia, costochondritis, displasia espondiloepimetáfisaria, hernia de disco vertebral, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones y policondritis recurrente (denominadas habitualmente en el presente documento "enfermedades asociadas a agrecano").

Dicho componente básico CAP, p. ej., el ISVD o los ISVD que se unen a agrecano, se une preferentemente al tejido cartilaginoso tal como el cartílago y/o el menisco. En un aspecto preferido, el componente básico CAP presenta reactividad cruzada con otras especies y se une específicamente a uno o más de agrecano humano (SEQ ID NO: 155), agrecano de perro, agrecano bovino, agrecano de rata; agrecano de cerdo; agrecano de ratón, agrecano de conejo; agrecano de macaco cangrejero y agrecano de macaco de la India. La información estructural pertinente para agrecano puede encontrarse, por ejemplo, en los Números de Acceso de UniProt, como se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Un componente básico CAP preferido es un ISVD que se une a agrecano, preferentemente agrecano humano, preferentemente representado por la SEQ ID NO: 155 como se muestra en la Tabla B.

Tabla 2

nombre	número de acceso
agrecano humano (SEQ ID NO: 155)	P16112
agrecano de perro	Q28343
agrecano bovino	P13608
agrecano de rata	P07897
agrecano de cerdo (central)	Q29011
agrecano de ratón	Q61282
agrecano de conejo	G1U677-1
agrecano de macaco cangrejero	XP_002804990.1
agrecano de macaco de la India	XP_002804990.1

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un polipéptido o constructo de acuerdo con la invención, que comprende además, al menos un componente básico CAP.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un polipéptido o constructo de acuerdo con la invención, que comprende además al menos un ISVD que se une específicamente a agrecano, preferentemente elegido de entre los ISVD representados por las SEQ ID NO:s 156 y 157.

En un aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano, en donde dichos al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano pueden ser iguales o diferentes.

En un aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano, en donde dichos al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano se eligen independientemente del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 156-157.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano, en donde dichos al menos 2 ISVD que se unen específicamente a agrecano están representados por las SEQ ID NO:s 156-157.

En un aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, que comprende un ISVD que se une específicamente a agrecano, en donde dicho ISVD que se une específicamente a agrecano, se une específicamente a agrecano humano [SEQ ID NO: 155].

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho ISVD que se une específicamente a agrecano, se une específicamente a agrecano humano (SEQ ID NO: 155), agrecano de perro, agrecano bovino, agrecano de rata; agrecano de cerdo; agrecano de ratón, agrecano de conejo; agrecano de macaco cangrejero y agrecano de macaco de la India.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido como se reivindica en el presente documento, en donde dicho ISVD que se une específicamente a agrecano, se une preferentemente a tejido cartilaginoso tal como cartílago y/o menisco.

Se apreciará que el ISVD, el polipéptido y el constructo de la invención son preferentemente estables. La estabilidad de un polipéptido, constructo o ISVD de la invención se puede medir mediante ensayos habituales conocidos por el experto en la técnica. Los ensayos típicos incluyen (sin carácter limitante) ensayos en los que se determina la actividad de dicho polipéptido, constructo o ISVD, con posterior incubación en líquido sinovial durante un período de tiempo deseado, después de lo cual se determina nuevamente la actividad.

En un aspecto la presente invención se refiere a un ISVD, polipéptido o constructo de la invención que tiene una estabilidad de al menos 7 días, tal como al menos 14 días, 21 días, 1 mes, 2 meses o incluso 3 meses en líquido sinovial (SF) a 37 °C.

La actividad deseada del componente básico terapéutico, p. ej., ISVD que se une a ADAMTS5 en el polipéptido o constructo multivalente de la invención puede medirse mediante ensayos habituales conocidos por el experto en la técnica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un constructo, tal como se reivindica en el presente documento, que comprende al menos un ISVD o polipéptido y uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión diferentes. El uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión diferentes se eligen preferentemente del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de estas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una porción de Fc, y pequeñas proteínas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas, otros residuos aminoacídicos, etiquetas u otros restos funcionales, p. ej., toxinas, marcas, productos radioquímicos, etc.

En una realización, como se menciona más adelante, la presente invención se refiere a un constructo de la invención, tal como un polipéptido que comprende un resto que confiere una prolongación de la semivida, en donde dicho resto es un PEG. Por lo tanto, la presente invención se refiere también a un constructo o polipéptido de la invención que comprende PEG.

Los residuos aminoacídicos adicionales pueden o no cambiar, alterar o influir de otro modo en otras propiedades (biológicas) del polipéptido de la invención y pueden o no añadir más funcionalidad al polipéptido de la invención. Por ejemplo, tales residuos aminoacídicos:

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

b) pueden formar una secuencia señal o secuencia líder que dirija la secreción del polipéptido desde una célula hospedadora tras la síntesis (por ejemplo, para proporcionar una pre-, pro- o prepro-forma del polipéptido de la invención, dependiendo de la célula hospedadora utilizada para expresar el polipéptido de la invención). Los péptidos líder secretorios adecuados serán evidentes para el experto, y pueden ser como se describe posteriormente en el presente documento. Por lo general, tal secuencia líder estará conectada al extremo N del polipéptido, aunque la invención en su sentido más amplio no se limite a esto;

c) puede formar una "etiqueta", por ejemplo, una secuencia o residuo aminoacídicos que permita o facilite la purificación del polipéptido, por ejemplo, utilizando técnicas de afinidad dirigidas contra dicha secuencia o residuo. A partir de entonces, dicha secuencia o residuo puede eliminarse (p. ej., mediante escisión química o enzimática) para proporcionar el polipéptido (para este fin, la etiqueta puede conectarse opcionalmente a la secuencia de aminoácidos o secuencia polipeptídica a través de una secuencia conectora escindible o contener un motivo escindible). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de tales residuos son múltiples residuos de histidina, residuos de glutatión y una etiqueta myc tal como AAAEQKLISEEDLNGAA;

d) pueden ser uno o más residuos aminoacídicos que han sido funcionalizados y/o que pueden actuar como sitio de unión de grupos funcionales. Los residuos aminoacídicos adecuados y los grupos funcionales serán evidentes para el experto e incluyen, pero no se limitan a, los residuos aminoacídicos y grupos funcionales mencionados en el presente documento para los derivados de los polipéptidos de la invención.

También se incluyen en la presente invención constructos que comprenden un polipéptido y/o ISVD de la invención, que comprenden además otros restos funcionales, p. ej., toxinas, marcas, agentes radioquímicos, etc.

Los otros grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden ser, por ejemplo, grupos químicos, residuos, restos, que pueden o no ser por sí solos activos biológica y/o farmacológicamente. Por ejemplo, y sin limitación, esos grupos pueden estar conectados a uno o más ISVD o polipéptidos de la invención de manera que proporcionen un "derivado" del polipéptido o constructo de la invención.

En consecuencia, la invención en su sentido más amplio comprende también constructos y/o polipéptidos que son derivados de los constructos y/o polipéptidos de la invención. Estos derivados pueden obtenerse generalmente por modificación, y en particular, por modificación química y/o biológica (p. ej., modificación enzimática), de los constructos y/o polipéptidos de la invención y/o de uno o más de los residuos aminoacídicos que forman un polipéptido de la invención.

Los ejemplos de tales modificaciones, así como ejemplos de residuos aminoacídicos dentro de las secuencias polipeptídicas que pueden modificarse de esta manera (es decir, ya sea en la cadena principal de la proteína, pero preferentemente en una cadena lateral), los métodos y técnicas que se pueden utilizar para introducir tales modificaciones y los posibles usos y ventajas de tales modificaciones serán evidentes para el experto (véase también Zangi *et al.*, Nat Biotechnol 31(10):898-907, 2013).

Por ejemplo, tal modificación puede conllevar la introducción (p. ej., por unión covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos (funcionales), residuos o restos dentro o sobre el polipéptido de la invención, y en particular de uno o más grupos funcionales, residuos o restos que confieran una o más propiedades o funcionalidades deseadas al constructo y/o polipéptido de la invención. Los ejemplos de tales grupos funcionales serán evidentes para el experto.

Por ejemplo, dicha modificación puede incluir la introducción (p. ej., por unión covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más restos funcionales que aumenten la semivida, la solubilidad y/o la absorción del constructo o polipéptido de la invención, que reduzcan la inmunogenicidad y/o la toxicidad del constructo o polipéptido de la invención, que eliminen o atenúen cualquier efecto secundario indeseable del constructo o polipéptido de la invención, y/o que confieran otras propiedades ventajosas a y/o reduzcan las propiedades no deseadas del constructo o polipéptido de la invención; o cualquier combinación de dos o más de las anteriores. Los ejemplos de dichos restos funcionales y de técnicas para introducirlos serán evidentes para el experto, y en general pueden comprender todos los restos funcionales y técnicas que se mencionan en la técnica anterior general citada anteriormente en el presente documento, así como los restos funcionales y técnicas conocidos *per se* para la modificación de proteínas farmacéuticas y, en particular, para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (incluidos ScFv y anticuerpos de dominio único), para lo cual se hace referencia, por ejemplo, a Remington (Pharmaceutical Sciences, 16.^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980). Tales restos funcionales pueden, por ejemplo, estar conectados directamente (por ejemplo, covalentemente) a un polipéptido de la invención, u opcionalmente a través de un conector o espaciador adecuado, como nuevamente será evidente para el experto.

Un ejemplo específico es un polipéptido derivado o constructo de la invención en donde el polipéptido o constructo de la invención se ha modificado químicamente para aumentar su semivida (por ejemplo, mediante pegilación). Esta es una de las técnicas más ampliamente usadas para aumentar la semivida y/o reducir la inmunogenicidad de proteínas farmacéuticas y comprende la fijación de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) o derivados de este (tales como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). En general, puede usarse cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluidos, aunque sin limitación, anticuerpos de dominio (único) y ScFv); se hace referencia, por ejemplo, a Chapman (Nat. Biotechnol. 54: 531-545, 2002), Veronese y Harris (Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 453-456, 2003), Harris y Chess (Nat. Rev. Drug. Discov. 2: 214-221, 2003) y al documento WO 04/060965.

Asimismo, están comercializados diversos reactivos para la pegilación de proteínas, por ejemplo, por Nektar Therapeutics, EE. UU.

Preferentemente, se usa pegilación dirigida al sitio, en particular mediante un residuo de cisteína (véase, por ejemplo, Yang *et al.* (Protein Engineering 16: 761-770, 2003). Por ejemplo, a tal efecto, se puede unir PEG a un residuo de cisteína que se encuentre de manera natural en un polipéptido de la invención, se puede modificar un constructo o polipéptido de la invención para introducir convenientemente uno o más residuos de cisteína para la fijación de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprenda uno o más residuos de cisteína para la fijación de PEG puede fusionarse en el extremo N y/o C de un constructo o polipéptido de la invención, en todos casos utilizando técnicas de modificación de proteínas conocidas *per se* por el experto.

Preferentemente, para los constructos o polipéptidos 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.

Otra modificación, generalmente menos preferida, comprende la N-glucosilación u O-glucosilación, generalmente como parte de la modificación cotraduccional y/o postraduccional, dependiendo de la célula hospedadora utilizada para expresar el polipéptido de la invención.

Otra modificación adicional puede consistir en la introducción de una o más marcas detectables u otros grupos o restos generadores de señales, dependiendo del uso previsto del polipéptido o constructo de la invención. Las etiquetas y técnicas para unirlos, usarlos y detectarlas adecuadas serán evidentes para el experto, e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, marcas fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficocitrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído y fluorescamina y metales fluorescentes tales como ^{152}Eu u otros metales de la serie de los lantánidos), marcas fosforescentes, marcas quimioluminiscentes o marcas bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster teromático de acridinio, imidazol, sales de acridinio, éster de tipo oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radioisótopos (tales como ^3H , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , y ^{75}Se), metales, quelatos metálicos o cationes metálicos (por ejemplo, cationes metálicos tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{113}In , ^{131}I , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{67}Ga , y ^{68}Ga u otros metales o cationes metálicos que son especialmente adecuados para su uso en diagnóstico y obtención de imágenes *in vivo*, *in vitro* o *in situ* tales como (^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr , y ^{56}Fe)), así como cromóforos y enzimas (tales como malato·deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, isomerasa delta-V-esteroide, alcohol·deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato·deshidrogenasa, triosa fosfato·isomerasa, biotinavidina·peroxidasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa·oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato·deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina·esterasa). Para el experto serán evidentes otras etiquetas adecuadas, e incluyen, por ejemplo, restos que pueden detectarse usando RMN o espectroscopia ESR.

Dichos polipéptidos y constructos marcados de la invención pueden usarse, por ejemplo, para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluidos inmunoensayos conocidos *per se* tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos sándwich", etc.), así como para fines de diagnóstico y obtención de imágenes *in vivo*, dependiendo de la elección de la marca específica.

Como será evidente para el experto, otra modificación puede conllevar 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 el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Otra modificación más puede incluir la introducción de un resto funcional que es una parte de un par de unión específico, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Dicho resto funcional puede usarse para conectar el polipéptido de la invención con otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de unión, es decir, a través de la formación del par de unión. Por ejemplo, un constructo o polipéptido de la invención puede conjugarse con biotina y conectarse con otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, dicho constructo o polipéptido conjugado de la invención puede usarse como indicador, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico donde se conjuga un agente productor de señales detectables con avidina o estreptavidina. Dichos pares de unión también pueden usarse, por ejemplo, para unir el constructo o polipéptido de la invención con un portador, incluidos portadores adecuados para fines farmacéuticos. Un ejemplo no limitante son las formulaciones liposómicas descritas por Cao y Suresh (Journal of Drug Targeting 8): 257, 2000). Dichos pares de unión también pueden usarse para conectar un agente terapéuticamente activo al polipéptido de la invención.

Para el experto serán evidentes otras posibles modificaciones químicas y enzimáticas. Dichas modificaciones también pueden introducirse con fines de investigación (p. ej., para estudiar las relaciones de función y actividad). Se hace referencia, por ejemplo, a Lundblad y Bradshaw (Biotechnol. Appl. Biochem. 26: 143-151, 1997).

Preferentemente, los constructos, polipéptidos y/o derivados son tales que se unen a ADAMTS5, con una afinidad (medida y/o expresada convenientemente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} o velocidad de asociación y/o una k_{off} o velocidad de disociación, o como alternativa, un valor de Cl_{50} , como se describe adicionalmente en el presente documento) que es como se define en el presente documento.

Tales constructos y/o polipéptidos de la invención y sus derivados también pueden estar en forma esencialmente aislada (como se define en el presente documento).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un constructo de la invención, que comprende o consiste esencialmente en un ISVD de acuerdo con la invención o un polipéptido de acuerdo con la invención, y que además comprende uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión diferentes, que se conectan opcionalmente a través de uno o más conectores peptídicos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un constructo de la invención, en el que uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión diferentes se eligen del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de estas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una porción de Fc, y proteínas pequeñas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas.

En los constructos de la invención, tales como los polipéptidos de la invención, los dos o más componentes básicos, tales como, p. ej., los ISVD, y el opcionalmente uno o más grupos, fármacos, agentes, residuos, restos o unidades de unión diferentes pueden estar directamente conectados entre sí (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/23221) y/o pueden estar conectados entre sí a través de uno o más espaciadores o conectores adecuados, o cualquier combinación de estos. Los espaciadores o conectores adecuados para su uso en polipéptidos multivalentes y multiespecíficos serán evidentes para el experto, y generalmente pueden ser cualquier conector o espaciador utilizado en la técnica para conectar secuencias de aminoácidos. Preferentemente, dicho conector o espaciador es adecuado para su uso en la construcción de constructos, proteínas o polipéptidos que están destinados para uso farmacéutico.

Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede ser, por ejemplo, un polipéptido trivalente, trisespecífico, que comprende un componente básico, tal como un ISVD que se une a ADAMTS5, un ISVD que se une a una albúmina y, potencialmente, otro componente básico, tal como un tercer ISVD, en el que dichos primer, segundo y tercer componentes básicos, tales como los ISVD, pueden estar conectados opcionalmente a través de una o más, y en particular 2, secuencias conectoras. Además, la presente invención proporciona un constructo o polipéptido de la invención que comprende un primer ISVD que se une a ADAMTS5 y posiblemente un segundo ISVD que se une a albúmina y/o posiblemente un tercer ISVD y/o posiblemente un cuarto ISVD, en donde dicho primer ISVD y/o dicho segundo ISVD y/o posiblemente dicho tercer ISVD y/o posiblemente dicho cuarto ISVD están conectados a través de conectores, en particular, 3 conectores.

Algunos conectores especialmente preferidos incluyen los conectores que se utilizan en la técnica para conectar fragmentos de anticuerpos o dominios de anticuerpos. Estos incluyen los conectores mencionados en la técnica anterior general citada anteriormente, así como, por ejemplo, los conectores que se utilizan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos scFv (en este sentido, sin embargo, debe tenerse en cuenta que, mientras que en los diacuerpos y en fragmentos scFv, la secuencia conectora utilizada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permiten que los dominios V_H y V_L pertinentes se unan para formar el sitio completo de unión a antígenos, no hay ninguna limitación particular en la longitud o la flexibilidad del conector utilizado en el polipéptido de la invención, ya que cada ISVD, tal como Nanobodies, por sí mismo forma un sitio completo de unión a antígenos).

Por ejemplo, un conector puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada, y en particular secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferentemente entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos aminoácidos. Algunos ejemplos preferidos de tales secuencias de aminoácidos incluyen conectores de gly-ser, por ejemplo, del tipo $(gty_xser_y)_2$, tales como (por ejemplo, $(gly_4ser)_3$ o $(gly_3ser_2)_3$, como se describe en el documento WO 99/42077 y los conectores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las solicitudes de Ablynx mencionadas en el presente documento (véanse, por ejemplo, los documentos WO 06/040153 y WO 06/122825), así como las regiones de tipo bisagra, tales como las regiones bisagra de anticuerpos de cadena pesada de origen natural o secuencias similares (tal como se describe en el documento WO 94/04678). En la Tabla C se muestran conectores preferidos.

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

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

Está englobado en el alcance de la invención que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del conector o los conectores utilizados (aunque no es crucial, como suele ser para los conectores utilizados en fragmentos scFv) pueden tener alguna influencia sobre las propiedades del constructo final de la invención, tal como el polipéptido de la invención, que incluyen, pero sin limitación, la afinidad, especificidad o avidez de una quimiocina, o para uno o más de los otros antígenos. Basándose en la divulgación del presente documento, el experto podrá determinar el conector o conectores óptimos para su uso en un constructo específico de la invención, tal como el polipéptido de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos habituales limitados.

Por ejemplo, en polipéptidos multivalentes de la invención que comprenden componentes básicos, ISVD o Nanobodies dirigidos contra ADAMTS5 y otra diana, la longitud y flexibilidad del conector son preferentemente tales que permiten que cada componente básico, tal como un ISVD, de la invención presente en el polipéptido se una a su diana afín, p. ej., el determinante antigénico en cada una de las dianas. Nuevamente, basándose en la divulgación del presente documento, el experto podrá determinar el conector o conectores óptimos para su uso en un constructo específico de la invención, tal como un polipéptido de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos habituales limitados.

También está comprendido en el alcance de la invención que el conector o los conectores utilizados confieren una o más propiedades o funcionalidad favorables diferentes a los constructos de la invención, tales como los polipéptidos de la invención, y/o proporcionan uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la fijación de grupos funcionales (p. ej., como se describe en el presente documento para los derivados de los ISVD de la invención). Por ejemplo, los conectores que contienen uno o más residuos aminoacídicos cargados pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que los conectores que forman o contienen pequeños epítopos o etiquetas se pueden utilizar con fines de detección, identificación y/o purificación. Nuevamente, basándose en la divulgación del presente documento, el experto podrá determinar los conectores óptimos para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos habituales limitados.

Finalmente, cuando se utilizan dos o más conectores en los constructos tales como polipéptidos de la invención, estos conectores pueden ser iguales o diferentes. Nuevamente, basándose en la divulgación del presente documento, el experto podrá determinar los conectores óptimos para su uso en un constructo o polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos habituales limitados.

Por lo general, para facilitar la expresión y la producción, un constructo de la invención, tal como un polipéptido de la invención, será un polipéptido lineal. Sin embargo, la invención en su sentido más amplio no se limita a este. Por ejemplo, cuando un constructo de la invención, tal como un polipéptido de la invención, comprende tres o más componentes básicos, ISVD o Nanobodies, es posible conectarlos mediante el uso de un conector con tres o más "brazos", estando cada "brazo" conectado a un componente básico, ISVD o Nanobody, de manera que se proporcione un constructo con "forma de estrella". También es posible, aunque generalmente menos preferido, utilizar constructos circulares.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un constructo de la invención, tal como un polipéptido de la invención, en donde dichos ISVD están directamente conectados entre sí o están conectados a través de un conector.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un constructo de la invención, tal como un polipéptido de la invención, en donde un primer ISVD y/o un segundo ISVD y/o posiblemente un ISVD que se une a albúmina sérica, están conectados a través de un conector.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un constructo de la invención, tal como un polipéptido de la invención, en donde dicho conector se elige del grupo que consiste en conectores 3A, 5GS, 7GS, 9GS, 10GS, 15GS, 18GS, 20GS, 25GS, 30GS, 35GS, poli-A, 8GS, 40GS, bisagra G1, bisagra 9GS-G1, región bisagra larga superior de llama y bisagra G3, tal como, p. ej., los presentados en la Tabla C (SEQ ID NO:s 158-174).

La divulgación se refiere además a los métodos para preparar los constructos, polipéptidos, ISVD, ácidos nucleicos, células hospedadoras, y composiciones que se describen en el presente documento.

Los polipéptidos multivalentes de la invención pueden prepararse generalmente mediante un método que comprende al menos el paso de conectar adecuadamente el ISVD y/o polipéptido monovalente de la invención con uno o más ISVD adicionales, opcionalmente a través del uno o más conectores adecuados, a fin de proporcionar el polipéptido multivalente de la invención. Los polipéptidos de la invención también pueden prepararse por un método que generalmente comprende al menos los pasos de proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, expresar dicho ácido nucleico de manera adecuada y recuperar el polipéptido expresado de la invención. Dichos métodos pueden realizarse de una manera conocida per se, que será evidente para el experto, por ejemplo, basándose en los métodos y técnicas descritos en más detalle en el presente documento.

Un método para preparar polipéptidos multivalentes de la invención puede comprender al menos los pasos de conectar dos o más ISVD de la invención y, por ejemplo, uno o más conectores entre sí de manera adecuada. Los ISVD de la invención (y los conectores) pueden acoplarse mediante cualquier método conocido en la técnica y como se describe en más detalle en el presente documento. Las técnicas preferidas incluyen conectar las

secuencias de ácidos nucleicos que codifican los ISVD de la invención (y los conectores) para preparar un constructo genético que exprese el polipéptido multivalente. Las técnicas para conectar aminoácidos o ácidos nucleicos serán evidentes para el experto, y se hace referencia de nuevo a los manuales estándar, tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente, así como a los Ejemplos más adelante.

En consecuencia, la presente invención también se refiere al uso de un ISVD de la invención para preparar un polipéptido multivalente de la invención. El método para preparar un polipéptido multivalente comprenderá conectar un ISVD de la invención a al menos otro ISVD de la invención, opcionalmente a través de uno o más conectores. El ISVD de la invención se utiliza a continuación como un dominio de unión o componente básico para proporcionar y/o preparar el polipéptido multivalente que comprende 2 (p. ej., en un polipéptido bivalente), 3 (p. ej., en un polipéptido trivalente), 4 (p. ej., en uno tetravalente) o más (p. ej., en un polipéptido multivalente) componentes básicos. A este respecto, el ISVD de la invención puede utilizarse como dominio de unión o unidad de unión para proporcionar y/o preparar un polipéptido multivalente, tal como bivalente, trivalente o tetravalente, de la invención que comprende 2, 3, 4 o más componentes básicos.

En consecuencia, la presente invención también se refiere al uso de un polipéptido ISVD de la invención (como se describe en el presente documento) en la preparación de un polipéptido multivalente. El método para preparar el polipéptido multivalente comprenderá conectar el ISVD de la invención a al menos otro ISVD de la invención, opcionalmente a través de uno o más conectores.

Los polipéptidos de la invención y los ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos de la invención pueden prepararse de una manera conocida *per se*, como será evidente para el experto, a partir de la descripción adicional en el presente documento. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención se pueden preparar de cualquier manera conocida *per se* para preparar anticuerpos y, en particular, para preparar fragmentos de anticuerpos (incluidos, entre otros, anticuerpos de dominio (único) y fragmentos scFv). Algunos métodos preferidos, pero no limitantes, para preparar los polipéptidos y ácidos nucleicos incluyen los métodos y técnicas descritos en el presente documento.

El método para producir un polipéptido de la invención podrá comprender los siguientes pasos: la expresión, en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado (también denominado en el presente documento "hospedador de la invención") o en otro sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de la invención (también denominado en el presente documento "ácido nucleico de la invención"); opcionalmente seguido del aislamiento y/o purificación del polipéptido de la invención obtenido de esta manera.

En particular, un método de este tipo puede incluir los pasos de: cultivar y/o mantener un hospedador de la invención en condiciones que permitan que dicho hospedador de la invención exprese y/o produzca al menos un polipéptido de la invención; opcionalmente, seguido del aislamiento y/o purificación del polipéptido de la invención obtenido de esta manera.

En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, ISVD o constructo de la invención (también denominado "ácido nucleico de la invención").

Un ácido nucleico de la divulgación puede estar en forma de ADN o ARN monocatenario o bicatenario. De acuerdo con una realización de la invención, el ácido nucleico de la divulgación está en forma esencialmente aislada, como se define en el presente documento. El ácido nucleico de la divulgación también puede estar en forma de, estar presente en y/o ser parte de un vector, p. ej., un vector de expresión, tal como, por ejemplo, un plásmido, cosmido o YAC, que de nuevo puede estar en una forma esencialmente aislada. En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos de la invención.

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden prepararse u obtenerse de una manera conocida *per se*, basándose en la información sobre los polipéptidos de la invención proporcionada en el presente documento, y/o pueden aislarse de una fuente natural adecuada. Además, como será evidente para el experto, para preparar un ácido nucleico de la divulgación, también se pueden conectar entre sí, de manera adecuada, varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos dos ácidos nucleicos que codifican ISVD de la invención y, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican uno o más conectores. Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la divulgación serán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, la síntesis automatizada de ADN; la mutagénesis dirigida al sitio; la combinación de dos o más secuencias de origen natural y/o sintéticas (o dos o más partes de estas); la introducción de mutaciones que propician la expresión de un producto de expresión truncado; la introducción de uno o más sitios de restricción (p. ej., para crear casetes y/o regiones que puedan

digerirse y/o ligarse fácilmente utilizando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones mediante una reacción de PCR utilizando uno o más cebadores "no coincidentes". Estas y otras técnicas serán evidentes para el experto, y nuevamente se hace referencia a los manuales estándar, tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente, así como a los Ejemplos más adelante.

En una realización preferida pero no limitante, un constructo genético de la divulgación comprende

a) al menos un ácido nucleico de la invención;

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

c) uno o más elementos adicionales de constructos genéticos conocidos *per se*;

en el que los términos "elemento regulador", "promotor", "terminador" y "conectado operativamente" tienen su significado habitual en la técnica.

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

Los ácidos nucleicos de la divulgación y/o los constructos genéticos de la divulgación pueden utilizarse para transformar una célula hospedadora u organismo hospedador, es decir, para la expresión y/o producción del polipéptido de la invención. Para el experto serán evidentes los hospedadores o células hospedadoras adecuados, y estos pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota (no humano) adecuado, así como todas las demás células hospedadoras u hospedadores (no humanos) conocidos *per se* para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluidos, entre otros, anticuerpos de dominio (único) y fragmentos scFv), que serán evidentes para el experto. También se hace referencia a la técnica anterior general citada anteriormente en el presente documento, así como a, por ejemplo, los documentos WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken *et al.* (Res Immunol. 149: 589-99, 1998); Riechmann y Muyldermans (1999), *supra*; van der Linden (J. Biotechnol. 80: 261-70, 2000); Joosten *et al.* (Microb. Cell Fact. 2: 1, 2003); Joosten *et al.* (Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 384-92, 2005); y las referencias adicionales citadas en el presente documento. Además, los polipéptidos de la invención también pueden expresarse y/o producirse en sistemas de expresión sin células, y los ejemplos adecuados de tales sistemas serán evidentes para el experto. Las técnicas adecuadas para transformar un hospedador o célula hospedadora de la invención serán evidentes para el experto y pueden depender de la célula hospedadora/organismo hospedador previsto y del constructo genético que se vaya a utilizar. De nuevo, se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente. La célula hospedadora transformada (que puede estar en forma de una línea celular estable) u organismo hospedador (que puede estar en forma de una línea o cepa mutante estable) forman aspectos adicionales de la presente divulgación. En consecuencia, la presente divulgación se refiere a un hospedador o célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la divulgación, o un vector de expresión de acuerdo con la divulgación. Preferentemente, estas células hospedadoras u organismos hospedadores son tales que expresan, o son (al menos) capaces de expresar (p. ej., en condiciones adecuadas), un polipéptido de la invención (y en el caso de un organismo hospedador: en al menos una célula, parte, tejido u órgano de este). La divulgación también incluye otras generaciones, progenie y/o descendencia de la célula hospedadora u organismo hospedador de la invención, que pueden obtenerse, por ejemplo, por división celular o por reproducción sexual o asexual.

Para producir/obtener la expresión de los polipéptidos de la invención, la célula hospedadora transformada u organismo hospedador transformado pueden en general conservarse, mantenerse y/o cultivarse en condiciones tales que el polipéptido (deseado) de la invención se exprese/produzca. Las condiciones adecuadas serán evidentes para el experto y habitualmente dependerán de la célula hospedadora/organismo hospedador usado, así como de los elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia de nucleótidos (relevante) de la invención. Una vez más, se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente en los párrafos sobre los constructos genéticos de la invención.

El polipéptido de la invención puede entonces aislarse de la célula hospedadora/organismo hospedador y/o del medio en el que se cultivó dicha célula hospedadora u organismo hospedador, usando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas *per se*, tales como técnicas de cromatografía y/o electroforesis (preparativas), técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (p. ej., usando una secuencia de aminoácidos específica, escindible fusionada con el polipéptido de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir, usando anticuerpos contra el polipéptido que se va a aislar).

En un aspecto, la divulgación se refiere al método para producir un constructo, polipéptido o ISVD de acuerdo con la invención que comprende al menos los pasos de: (a) expresar, en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación; y después opcionalmente (b) aislar y/o purificar el constructo, polipéptido o ISVD de acuerdo con la invención.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención.

Como se ha mencionado anteriormente, se siguen necesitando medicamentos seguros y eficaces para la OA. Basándose en estrategias no convencionales de cribado, caracterización y combinaciones, los presentes inventores identificaron ISVD que se unen a y que inhiben ADAMTS5. Estas moléculas que se unen a ADAMTS5 funcionaron excepcionalmente bien en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Además, también se demostró que los ISVD de la invención eran significativamente más eficaces que los compuestos de la técnica anterior. Por lo tanto, la presente invención proporciona ISVD y polipéptidos que ejercen un efecto antagonista respecto a ADAMTS, en particular ADAMTS5, con mejores propiedades profilácticas, terapéuticas y/o farmacológicas, incluido un perfil más seguro, en comparación con las secuencias de aminoácidos y anticuerpos de la técnica anterior. Además, estas moléculas que se unen a ADAMTS5 cuando se conectan a ISVD que se unen a albúmina se retuvieron durante más tiempo en un sujeto, y pudieron ser administradas sistemáticamente a la vez que conservaban la actividad.

En un aspecto la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en un individuo, por ejemplo, en los que está involucrada la actividad de ADAMTS5, comprendiendo el método administrar un ISVD o polipéptido de acuerdo con la invención a dicho individuo en una cantidad eficaz para tratar o prevenir un síntoma de dicha enfermedad o trastorno.

En un aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la invención para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de un ISVD, polipéptido y/o constructo de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad asociada con ADAMTS5; y/o para su uso en uno o más de los métodos de tratamiento mencionados en el presente documento.

La divulgación también se refiere al uso de un ISVD, polipéptido y/o constructo de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno que puede prevenirse y/o tratarse modulando la actividad de un ADAMTS, preferentemente ADAMTS5, p. ej., inhibiendo la degradación de agregano.

La divulgación también se refiere al uso de un ISVD, polipéptido, compuesto y/o constructo de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad, trastorno o afección que puede prevenirse y/o tratarse administrando un ISVD, polipéptido, compuesto y/o constructo de la invención a un paciente.

La invención se refiere además a un ISVD, polipéptido, compuesto y/o constructo de la invención o a una composición farmacéutica que los comprende para su uso en la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad asociada con ADAMTS5.

Se prevé que las moléculas que se unen a ADAMTS5 de la invención se pueden utilizar en diversas enfermedades que afectan al cartílago, tales como artropatías y condrodistrofias, enfermedades artríticas, tales como la osteoartritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis psoriásica, rotura o desprendimiento traumáticos, acondroplasia, costocondritis, displasia espondiloepimetáfisis, hernia de disco vertebral, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones y policondritis recurrente, osteocondritis disecante y agrecanopatías y esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) (denominadas habitualmente en el presente documento "enfermedades asociadas con ADAMTS5")

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o prevención de un síntoma de una enfermedad asociada con ADAMTS5 seleccionada del grupo que consiste en artropatías, condrodistrofias, enfermedad artrítica, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis psoriásica, rotura o desprendimiento traumáticos, acondroplasia, costocondritis, displasia espondiloepimetáfisis, hernia de disco vertebral, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones, policondritis recurrente, osteocondritis disecante y agrecanopatías.

En un aspecto la presente divulgación se refiere a un método para prevenir o tratar artropatías y condrodistrofias, enfermedades artríticas, tales como la osteoartritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis psoriásica, rotura o desprendimiento traumáticos, acondroplasia, costocondritis, displasia espondiloepimetáfisis, hernia de disco

vertebral, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones y policondritis recurrente y NASH en donde dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de al menos una composición, inmunoglobulina, polipéptido, o constructo de acuerdo con la invención a una persona que lo necesite.

En un aspecto la presente divulgación se refiere al uso de un ISVD, polipéptido, composición o constructo de acuerdo con la invención, en la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir tales como artropatías y condrodistrofias, enfermedades artríticas, tales como la osteoartritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis psoriásica, rotura o desprendimiento traumáticos, acondroplasia, costocondritis, displasia espondiloepimetáfisaria, hernia de disco vertebral, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones, y policondritis recurrente, osteocondritis disecante y agrecanopatías y NASH.

También se espera que al unirse a agrecano, los constructos y/o polipéptidos de la invención puedan reducir o inhibir una actividad de un miembro de la familia de la serina proteasa, cathepsinas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), tales como, por ejemplo, MMP20, pero también ADAMTS4 (agrecanasa-1) y/o ADAMTS11 en agrecano en degradación.

En el contexto de la presente invención, el término "prevención y/o tratamiento" no solo comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, sino que comprende también generalmente prevenir la aparición de la enfermedad, ralentizar o revertir la evolución 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 esta y/o prevenir un mayor aumento de la gravedad de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con esta, prevenir, reducir o revertir cualquier daño fisiológico causado por la enfermedad y, en general, cualquier acción farmacológica que sea beneficiosa para el paciente que se está tratando.

La pauta posológica será determinada por el especialista y los factores clínicos. Como es bien sabido en las técnicas médicas, la dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, el peso, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, la actividad del polipéptido empleado (incluidos los anticuerpos), el tiempo y la vía de administración, la salud general, y la combinación con otras terapias o tratamientos. La materia proteínica farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 g y 100 mg/kg de peso corporal por dosis; sin embargo, también se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo. Si la pauta es una infusión continua, puede estar en el intervalo de 1 pg a 100 mg por kilogramo de peso corporal por minuto.

Un ISVD, polipéptido o constructo de la invención puede emplearse en una concentración de, p. ej., 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 o 50 pg/mL con el fin de inhibir y/o neutralizar una función biológica de ADAMTS en al menos aproximadamente un 50 %, preferentemente un 75 %, más preferentemente un 90 %, un 95 % o hasta un 99 %, y de la manera más preferente aproximadamente un 100 % (esencialmente de manera completa) según se determina mediante métodos muy conocidos en la técnica.

En general, la pauta de tratamiento comprenderá la administración de uno o más ISVD, polipéptidos y/o constructos de la invención, o de una o más composiciones que los comprendan, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente eficaces. La cantidad o las cantidades o dosis específicas que se administrarán pueden ser determinadas por el médico, de nuevo basándose en los factores citados anteriormente. Las dosis útiles de los constructos, polipéptidos y/o ISVD de la invención pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en modelos animales. En la técnica se conocen métodos para la extrapolación de dosis eficaces en ratones y otros animales, a seres humanos; por ejemplo, véase el documento US 4 938 949.

En general, dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección específicos que se van a tratar, la potencia del ISVD, polipéptido y/o constructo específicos de la invención que se van a utilizar, la ruta específica de administración y la formulación o composición farmacéutica específicas utilizadas, el médico podrá determinar una pauta posológica adecuada.

La cantidad de los constructos, polipéptidos y/o ISVD de la invención requerida para su uso en el tratamiento variará no solo con la inmunoglobulina, polipéptido, compuesto y/o constructo particulares seleccionados, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y condición del paciente y, en última instancia, dependerá del criterio del médico o especialista. También la dosis de los constructos, polipéptidos y/o ISVD de la invención varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto u órgano diana.

La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una única dosis o como dosis divididas administradas a intervalos adecuados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La subdosis en sí puede dividirse asimismo, p. ej., en una serie de administraciones discretas y separadas de manera no muy precisa.

Una pauta de administración podría incluir un tratamiento diario a largo plazo. Por "a largo plazo" se entiende por lo menos dos semanas y preferentemente varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este intervalo posológico pueden ser determinadas por un experto ordinario en la técnica usando solo experimentación habitual habida cuenta del contenido del presente documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosis también puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier complicación.

Por lo general, en el método anterior, se utilizará un ISVD, polipéptido y/o constructo de la invención. Sin embargo, está comprendido en el alcance de la invención utilizar dos o más ISVD, polipéptidos y/o constructos de la invención en combinación.

Los ISVD, polipéptidos y/o constructos de la invención pueden utilizarse en combinación con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como una pauta de tratamiento combinada, que puede dar lugar o no a un efecto sinérgico.

La composición farmacéutica también puede incluir al menos un agente activo adicional, p. ej., uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas adicionales.

Una vez más, el médico podrá seleccionar estos compuestos o principios adicionales, así como una pauta de tratamiento combinado adecuada, basándose en los factores citados anteriormente y su experto criterio.

En particular, los ISVD, polipéptidos y/o constructos de la invención pueden ser utilizados en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos que son o pueden ser utilizados para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades, trastornos y afecciones que se mencionan en el presente documento, como resultado de lo cual se puede obtener 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.

Cuando se vayan a utilizar dos o más sustancias o principios como parte de una pauta de tratamiento combinado, pueden administrarse por la misma vía de administración o por diferentes vías de administración, esencialmente al mismo tiempo o en diferentes momentos (p. ej., esencialmente simultáneamente, consecutivamente o según una pauta alternativa). Cuando las sustancias o principios se administren simultáneamente a través de la misma vía de administración, podrán administrarse como diferentes formulaciones o composiciones farmacéuticas o como parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, como será evidente para el experto.

Además, cuando se vayan a utilizar dos o más principios o sustancias activos como parte de una pauta de tratamiento combinada, cada una de las sustancias o principios podrá administrarse en la misma cantidad y según la misma pauta que se utilice cuando el compuesto o principio se utilice por sí solo, y tal uso combinado puede producir o no un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de las dos o más sustancias o principios activos dé lugar a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de una, más o todas las sustancias o principios que se van a administrar, sin dejar de lograr la acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil, por ejemplo, para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario no deseado asociado con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se utilizan en sus cantidades habituales, sin dejar de obtener el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

La eficacia de la pauta de tratamiento utilizada de acuerdo con la divulgación puede determinarse y/o seguirse de cualquier manera conocida *per se* para la enfermedad, trastorno o afección involucrados, como será evidente para el médico. El médico también podrá, cuando proceda y caso por caso, cambiar o modificar una pauta de tratamiento particular, a fin de lograr el efecto terapéutico deseado, evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados y/o lograr un equilibrio adecuado entre lograr el efecto terapéutico deseado, por una parte, y evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados, por otra.

Generalmente, la pauta de tratamiento se seguirá hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o mientras se deba mantener el efecto terapéutico deseado. Una vez más, esto lo puede determinar el médico.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para uso farmacéutico), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales. En un aspecto particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un constructo, polipéptido, ISVD o ácido nucleico de acuerdo con la invención, preferentemente al menos una de las SEQ ID NOs: 000 y al menos un portador, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para uso farmacéutico), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

El sujeto que se va a tratar puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más en particular un ser humano. En las aplicaciones veterinarias, el sujeto que se va a tratar incluye cualquier animal criado con fines comerciales o mantenido como mascota. Como quedará claro para el experto, el sujeto que se va a tratar será, en particular, una persona que padezca, o en riesgo de padecer, las enfermedades, trastornos y afecciones mencionadas en el presente documento. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de la invención son para uso en medicina o diagnóstico. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas son para uso en medicina humana, pero también se pueden utilizar con fines veterinarios.

Una vez más, en tal composición farmacéutica, la una o más inmunoglobulinas, polipéptidos, compuestos y/o constructos de la invención, o nucleótidos que los codifican, y/o una composición farmacéutica que los comprende, también pueden combinarse adecuadamente con uno o más de otros principios activos, tales como los mencionados en el presente documento.

La invención también se refiere a una composición (tal como, sin limitación, una composición o preparado farmacéuticos como se describe en el presente documento) para su uso, ya sea *in vitro* (p. ej., en un ensayo *in vitro* o celular) o *in vivo* (p. ej., en un organismo unicelular o multicelular, y en particular en un mamífero, y más en particular en un ser humano, tal como en un ser humano que está en riesgo o padece una enfermedad, trastorno o afección de la invención).

Debe entenderse que la referencia al tratamiento incluye tanto el tratamiento de los síntomas establecidos como el tratamiento profiláctico, a menos que se indique explícitamente otra cosa.

Generalmente, para uso farmacéutico, los constructos, polipéptidos y/o ISVD de la invención pueden formularse como un preparado o composición farmacéuticos que comprendan al menos un constructo, polipéptido y/o ISVD de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos 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, por parche cutáneo, por implante, por supositorio, etc., en donde se prefiere la administración parenteral. Tales formas de administración adecuadas - que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la forma de administración - así como los métodos y portadores para su uso en la preparación de estas, serán evidentes para el experto, y se describen con más detalle en el presente documento. Tal preparado o composición farmacéuticos generalmente se denominarán en el presente documento una "composición farmacéutica".

Como excipientes ejemplares, se pueden mencionar disgregantes, aglutinantes, rellenos y lubricantes. Ejemplos de disgregantes incluyen agar-agar, alginas, carbonato de calcio, celulosa, dióxido de silicio coloidal, gomas, silicato de magnesio y aluminio, metilcelulosa y almidón. Los ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los ejemplos de rellenos incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio tribásico, carboximetilcelulosa de calcio, celulosa, dextrina, dextrosa, fructosa, lactitol, lactosa, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, maltitol, maltodextrinas, maltosa, sorbitol, almidón, sacarosa, azúcar y xilitol. Los ejemplos de lubricantes incluyen agar, oleato de etilo, laureato de etilo, glicerina, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, óxido de magnesio, estearatos, manitol, poloxámero, glicoles, benzoato de sodio, laurilsulfato de sodio, estearilo sodio, sorbitol, y talco. Los estabilizantes, conservantes, agentes humectantes y emulsionantes, agentes que mejoran la consistencia, agentes que mejoran el sabor, sales para variar la presión osmótica, sustancias tampón, solubilizantes, diluyentes, emolientes, colorantes y agentes enmascarantes y antioxidantes habituales se tienen en cuenta como adyuvantes farmacéuticos.

Los portadores adecuados incluyen, entre otros, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, cera con bajo punto de fusión, manteca de cacao, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares.

Generalmente, los constructos, polipéptidos y/o ISVD de la invención pueden ser formulados y administrados de cualquier manera adecuada conocida *per se*. Se hace referencia, por ejemplo, a la técnica anterior general citada anteriormente (y en particular a los documentos WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 y WO 08/020079), así como a los manuales estándar, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed., Mack Publishing Company, EE. UU. (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21.^a Edición, Lippincott Williams and Wilkins (2005); o Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (véanse, por ejemplo, las páginas 252-255).

En un aspecto particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención, y que además comprende al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante

farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprende uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

Los constructos, polipéptidos y/o ISVD de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier manera conocida *per se* para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos convencionales (incluidos scFv y diacuerpos) y otras proteínas farmacéuticamente activas. Tales formulaciones y métodos para prepararlas serán evidentes para el experto, y, por ejemplo, incluyen preparados preferibles para la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intraarterial, intranasal, intratecal o intrabronquial) pero también para administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

Los preparados para la administración parenteral pueden ser, por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que son adecuadas para la infusión o la inyección. Los portadores o diluyentes adecuados para tales preparados, por ejemplo, incluyen, sin limitación, los mencionados en la página 143 del documento WO 08/020079. Por lo general, se preferirán soluciones o suspensiones acuosas.

Los constructos, polipéptidos y/o ISVD de la invención también se pueden administrar utilizando métodos de suministro conocidos de terapia génica, véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N.º 5 399 346. Usando un método de suministro de terapia génica, las células primarias transfectadas con el gen que codifica un constructo, polipéptido y/o ISVD de la invención pueden ser transfectadas adicionalmente con promotores específicos de tejido para actuar en órganos, tejidos, injertos, tumores o células específicos y pueden, además, ser transfectadas con secuencias de señal y de estabilización para la expresión circunscrita subcelularmente.

De acuerdo con otros aspectos de la divulgación, el polipéptido de la invención puede utilizarse en aplicaciones adicionales *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden emplearse con fines diagnósticos, p. ej., en ensayos diseñados para detectar y/o cuantificar la presencia de ADAMTSS y/o para purificar ADAMTSS. Los polipéptidos también pueden estudiarse en modelos en animales de enfermedades particulares y para la realización de estudios toxicológicos, de seguridad y posológicos.

Por último, la divulgación se refiere a un kit que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la invención, al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica dichos componentes, el vector o sistema vectorial de la invención, y/o una célula hospedadora de acuerdo con la invención. Se contempla que el kit pueda ofrecerse en diferentes formas, p. ej., como un kit de diagnóstico.

La invención se describirá a continuación en más detalle mediante los siguientes aspecto, ejemplos y figuras preferidos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Generación de proteína ADAMTS5 recombinante de diferentes especies

Se generaron varios formatos de proteína ADAMTS5 recombinante bovina, de rata, cobaya, ratón y mono cangrejero internamente a través del sistema de expresión HEK293 Flp-In™ utilizando el reactivo de transfección FuGENE® HD (Promega). Dos días después de la transfección, se añadió medio de selección que contenía 100µg/mL de HygromycinB a las células para seleccionar las células con expresión estable.

Las células con expresión estable se expandieron. Se recogió medio acondicionado que contenía ADAMTS5 secretado a diario de las células, se purificó por cromatografía HisTrap seguido de un intercambio de tampón en tampón Hepes 50 mM pH 7,5. Se confirmó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 2 Inmunización de llamas con proteína ADAMTS5, clonación de repertorios de fragmentos de anticuerpos de cadena pesada únicamente y preparación de fagos

2.1 Inmunizaciones

Después de la aprobación del Comité Ético de la Facultad de Medicina Veterinaria (Universidad de Gante, Bélgica), se inmunizaron 3 llamas con proteína ADAMTSS humana recombinante (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 2198-AD).

2.2 Clonación de repertorios de fragmentos de anticuerpos de cadena pesada únicamente y preparación de fagos

Después de la inyección final del inmunógeno, se recogieron muestras de sangre. A partir de estas muestras de sangre, se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando Ficoll-Hypaque según las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.). A partir de las PBMC, se extrajo el ARN total y se utilizó como material de partida para RT-PCR para amplificar los segmentos de ADN que codificaban VHH/Nanobody, esencialmente como se describe en el documento WO 05/044858. Posteriormente, los fagos se

prepararon de acuerdo con protocolos estándar (véase, por ejemplo, la técnica anterior y las solicitudes presentadas por Ablynx N.V. citadas en el presente documento) y se almacenaron después de la esterilización por filtración a 4 °C para su uso posterior.

5 Ejemplo 3 Selección de VHH específicos de ADAMTSS humana a través de la presentación en fagos

Los repertorios VHH obtenidos de todas las llamas y clonados en colecciones de fagos se utilizaron para seleccionar Nanobodies que se unían a ADAMTSS humana. Se inmovilizaron 5 µg/mL de proteína ADAMTSS humana recombinante (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 2198-AD) en una placa Maxisorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania), junto a un control negativo de 0 µg/mL de antígeno. Después de la incubación con las colecciones de fagos y el lavado exhaustivo, los fagos unidos se eluyen con tripsina (1 mg/mL), y se utilizan para infectar células de *E. coli*. Las células infectadas de *E. coli* se usaron para preparar el fago para la siguiente ronda de selección o se sembraron en placas de agar para su análisis. Además, se utilizaron colecciones sintéticas en tres rondas de selección consecutivas.

Se analizó el factor de enriquecimiento, que es el número de fagos presentes en la fracción eluida respecto a los controles, en los resultados de todas las rondas de selección. Se eligieron las mejores condiciones de selección para su análisis posterior.

Con el fin de examinar un resultado de selección para identificar moléculas de unión específicas, se recogieron colonias individuales de las placas de agar y se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos de 1 mL. La expresión de VHH controlada por LacZ fue inducida mediante la adición de IPTG. Se prepararon extractos periplasmáticos de acuerdo con protocolos estándar (véase, por ejemplo, la técnica anterior y las solicitudes presentadas por Ablynx N.V. citadas en el presente documento).

25 Ejemplo 4 Cribado de extractos periplasmáticos para seleccionar Nanobodies de bloqueo funcional

En un primer paso, se estudió la unión a ADAMTS5 humana recombinante por parte de los extractos periplasmáticos mediante ELISA. En resumen, se utilizó ADAMTSS humana recombinante (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 2198-AD) a una concentración de 1 µg/mL para recubrir placas MaxiSorp de 384 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos fueron bloqueados con una solución de caseína (1 %). Después de la adición de una dilución por un factor de 10 de los extractos periplasmáticos, se detectó la unión de Nanobody utilizando un conjugado anti-Flag-HRP de ratón (Sigma, St. Louis, EE. UU.) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato esTMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (SDT, Bruselas, Bélgica). Se consideró que los clones que mostraban señales ELISA superiores a la suma de la señal promedio de los controles irrelevantes de Nanobody y 3 veces la desviación estándar de los controles irrelevantes de Nanobody codificaban Nanobodies que se unían a ADAMTSS humana positivos.

Para identificar Nanobodies que son capaces de prevenir la escisión mediada por ADAMTSS de agregano, se estudiaron los clones en un ensayo enzimático FRET con ADAMTSS humana, utilizando HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, CaCl₂·2H₂O 5 mM, 0,1 % de CHAPS, 5 % de glicerol como tampón de ensayo. En resumen, se incubaron los extractos periplasmáticos que contenían Nanobodies que se unían a ADAMTS5 en una placa OptiPlate de 384 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.) con 10 µL de sustrato de péptido humano fluorogénico desactivado 25 µM (Abz-TEGEARGSVI-Dap(Dnp)-KK-NH₂, Anaspec, Seraing, Bélgica, n.º cat. 60431-1) y 10 µL de ADAMTSS humana 25 nM (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 2198-AD). Se controló la capacidad de los Nanobodies para prevenir la escisión mediada por ADAMTSS cada minuto durante 2 horas en un lector de placas Tecan Infinite M1000. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism. A partir de la curva de progresión enzimática, se determinó la velocidad inicial para el control negativo (v_0), así como la velocidad para cada clon de Nanobody en la placa (v_i) y la señal de fondo (S_b). Se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula $100 \cdot (1 - (v_i - S_b) / (v_0 - S_b))$.

Se utilizó extracto periplasmático que contenía Nanobody irrelevante como control negativo. Los extractos periplasmáticos que contenían ADAMTS5 Nanobodies que fueron capaces de disminuir la señal de fluorescencia en más de un 50 % respecto a la señal del control negativo fueron considerados Nanobodies inhibidores. Posteriormente se determinó la secuencia de ADN de los clones positivos.

En la Tabla 4.1 se presenta un resumen de los datos de cribado del extracto periplasmático. Las secuencias de aminoácidos de los Nanobodies anti-ADAMTS5 se muestran en la Tabla A-1.

60 Tabla 4.1 Resultados de cribado de extractos periplasmáticos que contienen Nanobodies anti-ADAMTSS

ID de secuencia	ELISA de unión	ensayo FRET	
	(DO 450 nm)	v_i (U/min)	% inh
2A02	1,646	2	91

ID de secuencia	ELISA de unión	ensayo FRET	
	(DO 450 nm)	vi (U/min)	% inh
2A12	1,745	-1	104
2C10	1,627	2	90
2D07	1,551	-1	104
2D12	1,354	2	90
2F03	1,842	-1	103
2G01	1,710	10	55
3B02	2,570	-1	105
3B03	2,295	2	93
3D01	2,573	-2	111
3D02	2,581	-2	111
7B11	0,368	2	90
9A05	ND	-3	113
9D03	ND	-2	110
9D09	ND	0	102
9D10	ND	-2	111
11B06	ND	-1	106
13E02	ND	0	99
3F04	2,555	19	8

Después de la clonación y la secuenciación, se identificaron varias familias, que consistían en clones con diferencias en las CDR, pero que mostraban características similares de unión e inhibición.

- 5 Después de la clonación y secuenciación, se identificó el Nanobody 02A12 como un miembro de la familia del clon 09D03 (consulte las Tablas A-1 y A-2). La variabilidad de la secuencia de las regiones CDR se muestra en las Tablas 4.1A, 4.1B y 4.1C a continuación. Se utilizaron las secuencias de aminoácidos de las CDR del clon 09D03 como referencia contra las cuales se compararon las CDR de los miembros de la familia (CDR1 comienza en la posición Kabat 26, CDR1 comienza en la posición Kabat 50, y CDR3 comienza en la posición Kabat 95).

10

Tabla 4.1A (CDR1 09D03)

09D03	CDR1*									
Numeración de Kabat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutaciones de la secuencia de tipo natural	G	S	A	V	S	V	N	A	M	A
		R	T	F		S	Y			G

* Hasta 6 mutaciones en CDR1 en un clon (SEQ ID NO: 22)

Tabla 4.1B (CDR21 09D03)

09D03	CDR2*									
Numeración de Kabat	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutaciones de la secuencia de tipo natural	G	I	S	R	S	A	G	R	T	Y

* Hasta 0 mutaciones en CDR2 en un clon (SEQ ID NO: 36)

Tabla 4.1C (CDR3 09D03)

09D03	CDR3*														
Numeración de Kabat	95	96	97	98	99	100	100a								
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
mutaciones de la secuencia de tipo natural	D	I	D	P	N	R	I	F	S	R	D	F	A	A	Y

* Hasta 0 mutaciones en CDR en un clon (SEQ ID NO: 54)

- 5 Después de la clonación y secuenciación, se identificó el clon 09A05 como un miembro de la familia del clon 03B02 (consulte las Tablas A-1 y A-2). La variabilidad de la secuencia de las regiones CDR se muestra en las Tablas 4.1D, 4.1E y 4.1F a continuación. Se utilizaron las secuencias de aminoácidos de las CDR del clon 03B02 como referencia contra las cuales se compararon las CDR de los miembros de la familia (CDR1 comienza en la posición Kabat 26, CDR1 comienza en la posición Kabat 50, y CDR3 comienza en la posición Kabat 95).

Tabla 4.1D (CDR1 03B02)

03B02	CDR1*									
Numeración de Kabat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutaciones de la secuencia de tipo natural	R	R	T	I	S	S	G	T	M	G

* Hasta 0 mutaciones en CDR1 en un clon (SEQ ID NO: 33)

10

Tabla 4.1E (CDR2 03B02)

03B02	CDR2*									
Numeración de Kabat	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutaciones de la secuencia de tipo natural	A	I	R	W	S	S	G	M	P	Y
								I	T	F

* Hasta 3 mutaciones en CDR2 en un clon (SEQ ID NO: 50)

Tabla 4.1F (CDR3 03B02)

03B02	CDR3*															
Numeración de Kabat	95	96	97	98	99	100	100a									
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
mutaciones de la secuencia de tipo natural	D	R	S	A	F	R	D	P	S	F	D	V	N	Y	E	Y
						I									E	

* Hasta 2 mutaciones en CDR en un clon (SEQ ID NO: 68)

15

- 20 Después de la clonación y secuenciación, se identificaron los clones 03D02 y 02C10 como miembros de la familia del clon 03D01 (consulte las Tablas A-1 y A-2). La variabilidad de la secuencia de las regiones CDR se muestra en las Tablas 4.1G, 4.1H y 4.1I a continuación. Se utilizaron las secuencias de aminoácidos de las CDR del clon 03D01 como referencia contra las cuales se compararon las CDR de los miembros de la familia (CDR1 comienza en la posición Kabat 26, CDR1 comienza en la posición Kabat 50, y CDR3 comienza en la posición Kabat 95).

Tabla 4.1G (CDR1 03D01)

03D01	CDR1*									
Numeración de Kabat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutaciones de la secuencia de tipo natural	G	F	T	F	S	P	Y	Y	M	G

* Hasta 0 mutaciones en CDR1 en un clon (SEQ ID NO: 28)

Tabla 4.1H (CDR2 03D01)

03D01	CDR2*									
Numeración de Kabat	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutaciones de la secuencia de tipo natural	A	I	S	R	S	R	G	T	T	Y
			T	W				I	L	

* Hasta 3 mutaciones en CDR2 en un clon (SEQ ID NO: 44)

Tabla 4.1I (CDR3 03D01)

03D01	CDR3*														
Numeración de Kabat	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
numeración absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
mutaciones de la secuencia de tipo natural	G	R	S	P	G	D	P	S	R	T	Y	L	Y	D	Y
	S													E	

* Hasta 1 mutación en CDR en un clon (SEQ ID NO: 62)

Los resultados anteriores demuestran que son permisibles algunas variaciones de aminoácidos, y que se sigan conservando las características de unión e inhibición. En particular, la unión a ADAMTSS no es un factor predictivo de la inhibición de la actividad de ADAMTSS5. Por ejemplo, el clon 3F04 es una potente molécula de unión pero un inhibidor débil.

Ejemplo 5 Caracterización de Nanobodies para ADAMTSS5 monovalentes purificados

Los clones seleccionados a partir del cribado descrito en el Ejemplo 4 se caracterizaron más exhaustivamente. Después de la transformación de *E. coli* (TG-1) con Nanobodies seleccionados, se indujo la expresión con la adición de IPTG 1 mM y permitió que siguiera durante 4 horas a 37 °C. Después de centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplasmáticos congelando-descongelando los sedimentos con centrifugación posterior. Estos extractos se utilizaron a continuación como material de partida para la purificación a través de IMAC en columnas de 1 mL HisTrap FF crude (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), seguido de la desalación a través de columnas de centrifugado Zeba (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.), lo que da como resultado en al menos un 95 % de pureza según la evaluación mediante SDS-PAGE.

5.1 Evaluación de Nanobodies que bloquean ADAMTSS5 en ensayos enzimáticos con ADAMTSS5

La capacidad de Nanobodies para prevenir la escisión mediada por ADAMTSS5 de agregano se confirmó en un ensayo enzimático FRET, esencialmente como se describe en el Ejemplo 4. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism. A partir de la curva de progresión enzimática, se determinó la velocidad inicial (v_i) y estos valores se determinaron gráficamente en función de las concentraciones de inhibidores y se calcularon los valores de CI_{50} . En esencia, el ensayo FRET humano con Nanobodies purificados confirmó los resultados descritos en el Ejemplo 4 con los extractos periplasmáticos. Las CI_{50} estuvieron comprendidas entre 1,8E-09 M y 3,7E-08 M. Notablemente, aunque el mAb 12F4 convencional tuvo una CI_{50} ligeramente mejor de 1,0E-09 M que los Nanobodies monovalentes, todos los Nanobodies mostraron una mejor eficacia (no se muestran los datos).

Junto al ensayo FRET, se realizó un ensayo AlphaLISA (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) de ADAMTSS humana con un oligopéptido agregano biotinilado 43-mérico como sustrato. Tras la escisión con ADAMTSS5 de este

sustrato, se libera un producto ARGSV con neoepítipo biotinilado, que puede ser detectado por las perlas donantes de estreptavidin-AlphaScreen y un anticuerpo anti-neoepítipo ("ARGSV") capturado en las perlasceptoras AlphaLISA recubiertas con anti-Ig de ratón, lo que da como resultado la generación de una señal de AlphaScreen luminiscente tras la excitación láser.

Para determinar el potencial inhibidor de los Nanobodies, se incubaron diluciones en serie de Nanobodies purificados (junto con un control positivo y un control negativo irrelevante de Nanobody) con ADAMTSS humana (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU., n.º cat. 2198-AD) durante 15 minutos a temperatura ambiente en una placa Optiplate de 384 pocillos (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). Tras la adición de un sustrato oligopeptídico agregado biotinilado 43-mérico (Biosyntan, Berlín, Alemania) y la incubación de 3 horas a 37 °C, la reacción se detuvo. El primer paso de detección se realizó mediante la adición de 5 µL de solución de detección 1 que comprende anticuerpo agregado contra el neoepítipo "ARGSV", mAb BC3 de ratón (MDBioproducts, Egg, Suiza) y las perlas donantes de estreptavidina AlphaScreen (Perkin Elmer). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 5 µL de una segunda solución de detección, que comprendía las perlasceptoras anti-ratón AlphaLISA (Perkin Elmer). Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. La medida se realizó leyendo las placas en el lector de placas Envision Multi label (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.).

Para determinar la capacidad de los Nanobodies para prevenir la escisión mediada por ADAMTSS del sustrato, se analizó la disminución de la señal en función de la concentración de Nanobody y se calcularon los valores de CI_{50} .

Los resultados se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Potencia (CI_{50}) y % de inhibición de ADAMTSS para Nanobodies y compuestos de referencia en el ensayo enzimático AlphaLISA humano.

ID del compuesto	Alfa-LISA humano	
	CI_{50} [M]	% de inhibición
mAb 12F4 H4L0	6,5E-11	100
2F03	7,5E-11	100
11B06	1,0E-10	100
9D03	1,1E-10	100
2A12	1,5E-10	100
2D07	1,9E-10	100
3D02	2,2E-10	100
3B02	3,0E-10	100
9A05	3,2E-10	100
3D01	3,9E-10	96
2C10	4,5E-10	100
rhTIMP3	6,1E-10	100
2D12	6,9E-10	100
9D10	9,7E-10	100
13E02	2,2E-09	100
9D09	2,6E-09	100
7B11	3,6E-09	100
2A02	4,3E-09	99
3B03	1,2E-08	100
MSC2310852A	1,4E-07	99

En el ensayo AlphaLISA, al menos tres Nanobodies monovalentes (2F03, 11B06 y 9D03) muestran valores de CI_{50} similares a los del mAb 12F4 convencional, mientras que el resto tiene valores más altos. Sin embargo, todos los

Nanobodies muestran una inhibición cercana a un 100 %. Notablemente, el Nanobody 3B03, que tiene un valor de CI_{50} al menos un factor 100 más alto que el mAb 12F04 sigue teniendo un 100 % de inhibición.

5.2 Evaluación de Nanobodies que bloquean ADAMTS5 en ensayos de explante bovino

Se realizó un ensayo de explante bovino para evaluar la capacidad de los Nanobodies para bloquear la degradación del cartílago en un ensayo *ex vivo*, en el que el sustrato se presenta en condiciones más similares a las condiciones fisiológicas en comparación con los ensayos bioquímicos. En resumen, se prepararon trocitos frescos de explante de cartílago bovino (diámetro 4 mm) a partir de articulaciones de rodilla de vaca y se incubaron en placas de 96 pocillos en presencia de IL-1 α para inducir la degradación del cartílago. Como medida de la degradación del cartílago/agreano, se detectó la liberación de GAG en el sobrenadante después de 5 días de incubación (37 °C, 7,5 % de CO₂) a través del colorante metacromático azul de 1,9-dimetilmetileno (emisión a 633 nm). Se incluyó sulfato de condroitina como patrón de ensayo. La eficacia se definió por medio de los controles inducidos por IL-1 α sin compuesto (0 %) y en presencia de MSC2310852A (efecto de un 100 %).

Los resultados se resumen en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Valores de CI_{50} de Nanobodies monovalentes en el ensayo de explante bovino.

ID	CI_{50} [M]	ID del experimento*
mAb 12F4 H4L0	3,2E-06	exp A
2F03	1,4E-08	exp A
11B06	4,80E-08	exp C
9D03	5,9E-08/2,7E-07	exp G/ exp F
2A12	2,40E-08	exp C
02D07	3,30E-08	exp C
3D02	8,80E-07	exp F
3B02	1,40E-07	exp D
9A05	5,10E-07	exp F
3D01	2,2E-08/1,3E-07	exp D/ exp G
2D12	8,00E-07	exp D
2A02	2,40E-06	exp D
* los resultados solo se pueden comparar dentro de 1 ensayo usando el mismo explante, con ID de experimento idéntica		

5.3 Agrupación de epítomos

Se realizó un "ensayo sándwich" SPR en un instrumento Biacore T100 para agrupar los Nanobodies ADAMTS5 en diferentes agrupaciones epitópicas. Con este fin, se inmovilizó cada Nanobody anti-ADAMTS5 en un chip de sensor CM5 a través de acoplamiento de aminos usando la química EDC y NHS. Después de un paso de captura de ADAMTS5 100 nM, se inyectaron Nanobodies purificados a una concentración de 1 μ M, cada uno en un solo ciclo y sin regeneración, con un tiempo de contacto superficial de 120 segundos y una tasa de flujo de 45 μ L/minuto. Las curvas se procesaron con el software Biacore T100 Evaluation y se evaluó la unión adicional a la ADAMTS5 capturada (agrupación diferente) o no (misma agrupación).

Los Nanobodies podrían dividirse en dos grupos: una agrupación grande ("agrupación 1"), que comprende todos los Nanobodies inhibidores que tienen epítomos similares o superpuestos, y un segundo grupo que comprende el Nanobody de unión, no funcional 3F04 que reconoce un epítomo diferente en ADAMTS5 ("agrupación 2").

La Tabla 5.3 resume los epítomos de unión de los Nanobodies estudiados.

Tabla 5.3 Agrupaciones epitópicas de los Nanobodies anti-ADAMTS5

agrupación 1	2A02	2A12	2C10	2D07	2D12	2F03	2G01	3B02	3B03
	3D01	3D02	7B11	9A05	9D03	9D09	9D10	11B06	13E02
agrupación 2	3F04								

5.4 Reactividad cruzada entre especies

La reactividad cruzada entre especies se evaluó inicialmente a través de un análisis SPR de la velocidad de disociación en un instrumento Biacore T100. Se estudió la unión de los nanobodies a ADAMTSS humana, de macaco cangrejero ("cyno"), de cobaya, de ratón y bovino. Con este fin, se inmovilizó ADAMTSS5 recombinante en un chip CM5 mediante acoplamiento de aminas usando EDC y NHS. Se inyectaron Nanobodies purificados durante 2 minutos a una concentración de 100 nM y se permitió la disociación durante 15 min con una tasa de flujo de 45 uL/min. La velocidad de disociación para cada Nanobody individual se determinó ajustando un modelo de interacción 1:1 (modelo de Langmuir) en las curvas de disociación individuales utilizando el software BIA Evaluation. Como referencia, se determinaron las velocidades de disociación en ADAMTSS humana en cada experimento.

Los resultados se resumen en la Tabla 5.4A.

Tabla 5.4A Resumen de los datos de reactividad cruzada entre especies de Nanobodies anti-ADAMTSS monovalentes

ID de Nanobody	Velocidad de disociación según SPR, kd (1/s) en ADAMTSS5						
	Experimento 1			Experimento 2		Experimento 3	
	Humano	Cyno	Cobaya	Humano	Ratón	Humano	Bovino
2F03	3,3E-05	2,2E-05	3,4E-05	6,5E-05	2,9E-04	9,7E-05	4,3E-05
11B06	1,7E-04	1,4E-04	1,7E-04	2,7E-04	5,3E-04	3,8E-04	2,4E-04
9D03	9,8E-04	9,2E-04	1,0 E-03	1,2E-03	3,7E-03	1,4E-03	9,9E-04
2A12	1,4E-04	1,0E-04	1,2 E-04	2,3E-04	4,4E-04	3,1E-04	1,7E-04
2D07	1,1E-03	9,8E-04	1,1E-03	9,4E-04	1,8E-03	1,0E-03	6,2E-04
3B02	7,3E-04	7,4E-04	1,0 E-03	8,5 E-04	2,0E-03	1,2E-03	1,1E-03
3D01	2,3E-04	2,0E-04	2,7E-04	3,2 E-04	6,4E-04	4,6E-04	3,5E-04

Para cada Nanobody estudiado, se observaron velocidades de disociación similares para todas las especies estudiadas.

Además, la reactividad cruzada para ADAMTSS5 de macaco cangrejero y cobaya también se examinó mediante la determinación de la potencia utilizando AlphaLISA, esencialmente como se describe en el Ejemplo 5.1, pero utilizando un sustrato oligopeptídico agrecano 43 de macaco cangrejero biotinilado y un sustrato oligopeptídico agrecano 43 biotinilado de cobaya. Para determinar la capacidad de los Nanobodies para prevenir la escisión mediada por ADAMTSS del sustrato, se analizó la disminución de la señal en función de la concentración de Nanobody y se calcularon los valores de CI₅₀.

Las potencias resultantes se resumen en la Tabla 5.4B.

Tabla 5.4B Resumen de los datos de reactividad cruzada entre especies de Nanobodies anti-ADAMTSS monovalentes

ID de Nanobody	Potencia (CI ₅₀ , M) AlphaLISA		
	Humano	Cyno	Cobaya
2F03	7,5E-11	8,1E-11	3,0 E-10
11B06	1,0E-10	1,2E-10	3,5 E-10
9D03	1,1E-10	1,2E-10	1,3E-10
2A12	1,5E-10	1,9E-10	5,3 E-10
2D07	1,9E-10	1,5E-10	3,6E-10
3B02	3,0E-10	1,9E-10	4,6E-10
3D01	3,9E-10	2,2E-10	3,5 E-10

Todos los Nanobodies y los compuestos de control bloquearon ADAMTSS humana y de macaco cangrejero con potencias similares. En el AlphaLISA de cobaya, los Nanobodies más potentes mostraron potencias ligeramente más bajas que en el AlphaLISA humano, pero esto es probablemente el resultado de una menor sensibilidad del ensayo debida al aumento de la concentración enzimática.

La reactividad cruzada en ratas de los Nanobodies 2A12, 2F03, 093 y 049 se evaluó mediante una determinación SPR de la afinidad utilizando Biacore T100. Para la referenciación, también se determinó la afinidad por ADAMTSS humana. Por lo tanto, las ADAMTSS de rata y humana se inmovilizaron en un chip CM5 a través de acoplamiento de aminas, utilizando la química de EDC y NHS. Los Nanobodies purificados se inyectaron durante 2 minutos a diferentes concentraciones (entre 1 y 1000 nM) y se permitió que se disociaran durante 25 min a una tasa de flujo de 45 µL/min. Las constantes cinéticas se calcularon a partir de los sensorgramas utilizando el software BIAEvaluation (interacción 1:1).

Como se presenta en la Tabla 5.4C, se obtuvieron afinidades similares en ADAMTSS humana y ADAMTS5 de rata para todos los Nanobodies estudiados. La afinidad del Nanobody 069 con semivida prolongada (véase más abajo) fue similar a la afinidad de su homólogo monovalente (que es el Nanobody 049), lo que indica que la adición de ALB11 en el extremo C no tiene ningún efecto sobre la afinidad. La afinidad del Nanobody biparatópico 130 con semivida prolongada fue mayor en ambas especies (15 veces para ADAMTSS humana y 10 veces para ADAMTSS de rata) en comparación con la afinidad del Nanobody 069 con semivida prolongada (Tabla 5.4C).

Tabla 5.4C Resumen general de afinidades en ADAMTSS humana y ADAMTS5 de rata

ID	Descripción	KD (nM) ADAMTS5 humana	KD (nm) ADAMTS5 de rata
2A12		1,9	1
2F03		1,6	0,7
093	3F04 (N100,Q)	4,9	5,3
049	11B06 (N52S)	3,5	1,7
069	049-35GS-ALB11	2,7	1,3
130	049-35GS-093-35GS-ALB11	0,18	0,13

5.5 Inhibición de la actividad de MMP-1 y MMP-14

Para confirmar la selectividad de los Nanobodies por ADAMTSS, se evaluó la inhibición de la actividad enzimática de MMP-1 y MMP-14 con ensayos FRET con las enzimas respectivas. En resumen, se incubó MMP-1 o MMP-14 humana activada durante 30 minutos a temperatura ambiente con 10 µL de una serie de diluciones de Nanobody. Después de la incubación, se añadieron 20 µL de sustrato de peptídico fluorogénico 5 µM o 2,5 µM, respectivamente (sustrato MMP fluorogénico Mca-PLGL-Dpa-AR-NH2 (R&D Systems n.º cat. ES001)). Se controló la capacidad de los Nanobodies para prevenir la escisión mediada por MMP-1 y MMP-14 cada minuto durante 2 horas a 37 °C en un lector de placas Tecan Infinite M1000.

Las curvas de titulación resultantes se muestran en la Figura 1.

Mientras que los inhibidores naturales TIMP2 y TIMP3 inhibieron la actividad de MMP-1 y MMP-14, ninguno de los Nanobodies estudiados mostró inhibición.

5.6 Inhibición de la actividad de ADAMTS4 humana

Para evaluar la inhibición de ADAMTS4 humana, se llevó a cabo un ensayo similar al AlphaLISA de ADAMTSS humana, esencialmente como se describe en el Ejemplo 5.1, pero utilizando ADAMTS4 humana (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 4307-AD). Para determinar la capacidad de los Nanobodies para prevenir la escisión mediada por ADAMTS4 humana del sustrato, se analizó la disminución de la señal en función de la concentración de Nanobody y se calcularon los valores de CI_{50} .

Los resultados se muestran en la Figura 2.

Mientras que la molécula pequeña MSC2310852A inhibió la actividad de ADAMTS4 humana, ninguno de los Nanobodies estudiados ni mAb 12F4 mostró actividad inhibitoria (véase **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Se describió que el anticuerpo monoclonal 12F4 (H4L0) era selectivo respecto a ADAMTS4 en el documento WO 2011/002968.

Ejemplo 6 Formateo de Nanobodies

6.1 Supresión de los motivos de N-glucosilación

Los motivos de N-glucosilación presentes en el Nanobody 11B06 (posición N52) y el Nanobody 3F04 (posición N110f) se suprimieron antes del formateo. Los sitios fueron aleatorizados por medio de una biblioteca de codones NNK. Dado que estas posiciones están ubicadas en las CDR, la mutación del motivo puede potencialmente influir en las características de unión. En consecuencia, se cribaron las colecciones para detectar posibles sustituciones que no afectaran a la propiedad de unión mediante el análisis SPR de la velocidad de disociación en ADAMTSS humana utilizando un instrumento Biacore T100, esencialmente como se describe en el Ejemplo 5.4.

Sorprendentemente, la sustitución del aminoácido N52 por Serine en el Nanobody 11B06 y el aminoácido N100_F por Glutamina en el Nanobody 3F04 no afectó a la unión (datos no mostrados).

Por lo tanto, como componentes básicos para el formato adicional, se utilizaron los Nanobodies 049 (=11B06 (N52S)) y 093 (3F04 (N100_FQ)) para representar los Nanobodies 11B06 y 3F04, respectivamente (véase la Tabla A-1).

6.2 Generación de Nanobodies formateados

Para la generación de constructos Nanobody con semivida prolongada que bloquean la actividad agreganasa de ADAMTSS humana, se fusionaron los Nanobodies 2A12, 2D07, 2F03, 049, 9D03 y 3B02 con una anti-albúmina sérica humana (HSA)-Nanobody ALB11 (véase la Tabla 6.3). Además, también se generaron constructos con semivida prolongada ALB11 a partir de una combinación de dos Nanobodies de diferentes epítomos de unión (una combinación de un miembro de la agrupación 1 y un miembro de la agrupación 2). Los constructos de Nanobody formateados se expresaron en *Pichia pastoris*, se secretaron en el medio de cultivo y se purificaron por afinidad en perlas de Proteína A Poros MabCaptureA (Applied Biosystems, Bleiswijk, Países Bajos, n.º cat. 4374729). Se confirmó la integridad de los constructos de Nanobody.

6.3 Potencia en AlphaLISA en ausencia y presencia de HSA

Los constructos de Nanobody formateados se estudiaron en el AlphaLISA, como se describe en el Ejemplo 5.1. Adicionalmente, se examinó la influencia de la unión a HSA en la potencia del Nanobody realizando el experimento en presencia de un exceso de HSA (concentración final de 4,2 µM).

Los valores de CI₅₀ de todos los constructos de Nanobody con semivida prolongada se enumeran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Potencias de constructos de Nanobody formateados (+/- HSA) según se determina en AlphaLISA

ID Nanobody	Descripción	CI ₅₀ (M)	
		- HSA	+ HSA
004	2A12-35GS-ALB11	1,3E-10	1,1E-10
005	2D07-35GS-ALB11	2,9E-10	3,4E-10
006	2F03-35GS-ALB11	7,0E-11	9,2E-11
069	049-35GS-ALB11	6,9E-11	9,8E-11
070	9D03-35GS-ALB11	4,1E-10	6,0E-10
071	3B02-35GS-ALB11	2,8E-10	4,1E-10
129	2F03-35GS-093*-35GS-ALB11	1,1E-10	ND
130	049 ² *-35GS-093-35GS-ALB11	9,7E-11	ND

ID Nanobody	CI ₅₀ (M)
	- HSA
2A12	1,5E-10
2D07	1,9E-10
2F03	7,5E-11
049	1,0E-10
9D03	1,1E-10
3B02	3,0E-10

131	9D03-35GS-093-35GS-ALB11	8,1E-11	ND
-----	--------------------------	---------	----

ND = no determinado; 093* = 3F04 (N100_FQ); 049²* = 11B06 (N52S)

Los resultados indican que ni el formateo de ALB11 ni la unión a HSA afectan la potencia de los constructos de Nanobody.

6.4 Unión a HSA

Se determinó la afinidad del Nanobody ALB11 a HSA mediante SPR en un Biacore T100. Con este fin, se inmovilizó HSA en un chip CM5 a través de acoplamiento de aminas y se procesó esencialmente como se describe en el Ejemplo 5.3. Como referencia, también se determinó la afinidad de ALB11 monovalente, que fue de 3,2 nM.

Los resultados se resumen en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Afinidad de constructos de HLE Nanobody por HSA

ID de FNb*	KD (nM)		
	FNb-ALB11	FNb-093 ^{3*} -ALB11	FNb-ALB11-093
2F03	46	66	52
049 ^{2*}	40	55	40
2A12	27	ND	ND
ND = no determinado; *FNb = Nanobody funcional; 049 ^{2*} = 11B06 (N52S); 093 ^{3*} = 3F04 (N100 _r Q)			

5

Todos los constructos de Nanobody ADAMTS5 con semivida prolongada tuvieron afinidades similares (véase la Tabla 6.4), que fue menor que la afinidad de ALB11 monovalente por HSA.

6.5 Determinación de la afinidad por ADAMTS5 humana con KinExA

10

Se determinó la afinidad del constructo de Nanobody 069 (049-35GS-ALB11) y el constructo de Nanobody 130 (049-35GS-093-ALB11) formateados (véase también Tabla 6.5) en solución con un ensayo de exclusión cinética en un instrumento KinExA3000 (Sapidyne, Boise, EE. UU.). Con este fin, se acopló ADAMTS5 humana a perlas de PMMA de acuerdo con las instrucciones del fabricante, descritas en detalle por Darling y Brault (2004 Assay Drug Dev Technol. 2:647-57). Se añadió una concentración fija del constructo de Nanobody (constructo de Nanobody 069 50 pM o constructo de Nanobody 130 5 pM) a una serie de diluciones de ADAMTS5 humana comprendida entre 2 nM - 0,2 pM y se incubó a temperatura ambiente durante 16 horas hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente, se inyectaron las mezclas mediante el automuestreador de KinExA sobre una columna empaquetada con perlas de PMMA conjugado con ADAMTS5 humana para capturar el constructo de Nanobody libre en las perlas y detectar con HSA marcada con Alexa647. Se representó gráficamente el porcentaje de constructo de Nanobody libre como una función de ADAMTS5 humana titulada y se ajustó utilizando el software KinExA Pro v3.2.6.

20

Los resultados se muestran en la Tabla 6.5.

25

Tabla 6.5 Afinidades de 2 constructos de Nanobody para unirse a ADAMTS5 humana según se determinó mediante KinExA

Nanobody	Descripción	KD (pM)
069	049*-35GS-ALB11	20,4
130	049-35GS-093*-ALB11	1,2
049* = 11B06 (N52S); 093 ^{2*} = 3F04 (N100 _r Q)		

30

Se observa una afinidad aproximadamente 20 veces mayor por el constructo del Nanobody 130 en comparación con el constructo del Nanobody 069. Estos datos confirman la ávida unión a ADAMTS5 humana del constructo del Nanobody 130.

Ejemplo 7 Optimización de secuencia (SO) de Nanobodies

35

Se sometieron a un proceso de optimización de secuencias al Nanobody 2F03, Nanobody 049 (11B06 (N52S)) y Nanobody 093 (3F04 (N100_rQ)) de ejemplo. La optimización de la secuencia es un proceso en el que una secuencia de Nanobody original es mutada y este proceso cubre la humanización (i) del Nanobody y las modificaciones post-traducción de tipo supresión (ii), así como epítopos para posibles anticuerpos preexistentes (iii). También se mutó el Nanobody ALB11 para suprimir epítopos para posibles anticuerpos preexistentes.

40

(i) Para fines de humanización, la secuencia del Nanobody original se muta para producir una secuencia de Nanobody que es más idéntica a la secuencia consenso de la línea germinal IGHV3-IGHJ humana. Los aminoácidos específicos en las regiones de armazón (con la excepción de los llamados residuos distintivos) que difieren entre el Nanobody y el consenso de la línea germinal IGHV3-IGHJ humana se alteran respecto al homólogo humano de tal manera que la estructura, la actividad y la estabilidad de la proteína se mantienen intactas. Se sabe que un puñado de residuos distintivos son cruciales para la estabilidad, actividad y afinidad del Nanobody y por lo tanto no se mutan.

45

(ii) Los aminoácidos presentes en las CDR y para los cuales hay datos experimentales de que son sensibles a las modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) se alteran de tal manera que el sitio de PTM se inactiva mientras que la estructura, actividad y estabilidad de la proteína se mantienen intactas.

- 5 (iii) La secuencia del Nanobody se optimiza, sin afectar la estructura, actividad y estabilidad de la proteína, para minimizar la unión de cualquier anticuerpo preexistente de origen natural y reducir la posibilidad de suscitar una respuesta de inmunogenicidad durante el tratamiento.

10 Para la generación de una secuencia optimizada del constructo de Nanobody 581 y constructo de Nanobody 579 formateados se conectaron los respectivos componentes básicos mediante conectores 35GS. El resultado fue el constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) y el constructo de Nanobody 579 (2F3^{SO}-conector 35GS-093^{SO}-conector 35GS-Alb11), respectivamente (consulte la Tabla A-1). Los constructos fueron producidos en *Pichia pastoris* como proteínas sin etiqueta y se purificaron a través de cromatografía de afinidad con Proteína A, seguida de desalación. Se confirmó la integridad de los constructos de Nanobody.

15 7.1 Afinidad por ADAMTS5 humana

La afinidad del constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) se determinó utilizando KinExA, como se describe en el Ejemplo 6.5 con algunas adaptaciones poco importantes del protocolo descrito. Se incubó una concentración fija de 20 pM del constructo de Nanobody 581 junto con una serie de diluciones de ADAMTS humana (diluciones en serie por un factor de 2,2 comprendidas entre 20 nM y 0,32 pM y un blanco sin ADAMTS). Para realizar pruebas sobre la interferencia de la albúmina, se añadió HSA a esta preincubación en experimentos seleccionados con ADAMTS humana, a una concentración de 100 veces su KD para el constructo de Nanobody 581. Las mezclas se incubaron y se permitió que alcanzaran el equilibrio durante 24 horas antes de la inyección mediante el automuestreador de KinExA sobre una columna empaquetada con perlas de PMMA conjugado con ADAMTS humana. El constructo de Nanobody 581 capturado se detectó usando una herramienta anti-Nanobody marcada con AF647 que reconoce el constructo de Nanobody 581 (generado por Ablynx).

Los resultados se presentan en la Tabla 7.1.

30 Tabla 7.1 Afinidad del constructo de Nanobody 581 para ADAMTS humana con y sin HSA

+ o - HSA	K _D (pM)	IC 95 % en K _D (pM)
- HSA (n=3)	3. 65 (CV 20 %)	2,27 - 5,86
+ HSA (n=3)	4,84 (CV 22%)	3,45 - 6,80

Los resultados muestran que la afinidad del constructo de Nanobody 581 para ADAMTS humana es de 3,65pM sin HSA y de 4,84 pM con HSA.

40 7.2 Afinidad por la albúmina sérica

Se determinó la afinidad del componente básico ALB11 en el constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) para unirse a la albúmina sérica (SA, por sus siglas en inglés) humana, de macaco cangrejero, cobaya, ratón y rata, utilizando SPR como se describe en el Ejemplo 5.3.

Los resultados se muestran en la Tabla 7.2.

45 Tabla 7.2 Afinidad (K_D, nM) del constructo de Nanobody 581 por la unión a albúmina sérica humana, de macaco cangrejero, cobaya, ratón y rata

ID de Nanobody	SA humana	SA cyno	SA de cobaya	SA de ratón	SA de rata
581	48	51	420	790	> 7500*
* la velocidad de disociación está fuera del límite de detección: > 5,0E-01 (1/s)					

50 7.3 Unión a pre-Ab

Se cribaron el constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) y el constructo de Nanobody 579 (2F3^{SO}-conector 35GS-093^{SO}-conector 35GS-Alb11) para detectar la unión a anticuerpos preexistentes (pre-Ab) de 3 conjuntos de muestras de suero relevantes de donantes (muestras de sujetos sanos, muestras de OA y un conjunto sesgado de muestras con unión residual conocida de pre-Ab a otros Nanobodies) mediante tecnología SPR con un instrumento Proteon XPR36. Se analizó la unión de las muestras de sangre a constructos de Nanobody anti-

ADAMTSS, los cuales fueron capturados en HSA. Se determinaron los niveles de unión de anticuerpos preexistentes después de referenciar por partida doble de los sensorgramas estableciendo los puntos indicadores en 125 segundos (5 segundos después del final de la asociación). El análisis se realizó con Proteon Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ambos constructos de Nanobody presentaron bajos niveles residuales de unión de pre-Ab, mostrando el constructo de Nanobody 581 claramente la menor unión residual a pre-Ab (consulte **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

7.4 Funcionalidad en AlphaLISA humano

Se realizó un AlphaLISA con el constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) utilizando ADAMTSS humana esencialmente como se describe en el Ejemplo 5.1.

Los resultados se muestran en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4 Potencia (pM) del constructo de Nanobody 581 según lo determinado por AlphaLISA.

Muestra	CI50 (pM)	IC 95 % (pM)
mAb 12F4H4L0	120	102 - 140
581	188	157 - 226

Los resultados muestran que la potencia del constructo de Nanobody 581 es de 188 pM.

7.5 Perfil de inmunogenicidad en el ensayo de células dendríticas-linfocitos T

Se determinó la inmunogenicidad relativa en un ensayo de proliferación de células dendríticas-linfocitos T. En esencia, se estudiaron los Nanobodies frente a un conjunto de 50 muestras de células de donantes sanos que contenían los alelos de HLA de clase II más abundantes, representando como tales a la mayoría de la población mundial. Se evaluó la respuesta inmune utilizando la proliferación de linfocitos T como marcador sustituto para la formación de anticuerpos anti-fármaco. Se utilizó hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) como control positivo. El control positivo KLH dio lugar a una respuesta positiva en todos los 50 donantes. Ninguno de los donantes dio positivo para el constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11). El constructo de Nanobody 579 (2F3^{SO}-conector 35GS-093^{SO}-conector 35GS-Alb11) dio lugar a una respuesta positiva en tres donantes, o el 6 %. En la condición de blanco (solo medio), 2 de cada 50 donantes, o el 4 %, respondieron de manera positiva. Estos resultados se utilizaron para establecer un umbral de respuesta global de más de 3 de cada 50 donantes, lo que corresponde a un umbral de respuesta global > 6 %. El potencial inmunógeno general de los Nanobodies estudiados se consideró bajo, ya que el porcentaje de respuestas positivas significativas fue ≤ 6 % (véase la Tabla 7.5).

Tabla 7.5 Resultado del perfil de inmunogenicidad determinado en un ensayo de Dc-linfocitos T

Producto de prueba	N.º respuestas positivas	Potencial inmunógeno
Blanco	2 (4%)	/
KLH	50 (100%)	/
581	0 (0%)	Bajo
579	3 (6%)	Bajo
Control Nb	1 (2%)	Bajo

7.6 Unión a ADAMTS1 humana

Se estudió la unión a ADAMTS1 humana en un ELISA de unión (véase **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.A**). En resumen, se recubrió con ADAMTS1 humana 18,5 nM (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 2197-AD) y ADAMTSS humana (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 2198-AD) placas MaxiSorp de 384 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Los pocillos se bloquearon con una solución de caseína (1 %) y las series de dilución de constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) y mAb anti-ADAMTS1 humana (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU., n.º cat MAB2197) y se estudió la unión en ambas proteínas

recubiertas. Después de la detección con una herramienta anti-Nanobody conjugada con HRP que reconoce el constructo de Nanobody 581 (generado por Ablynx) y un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP (Abcam, Cambridge, Reino Unido) respectivamente, y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato esTMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (SDT, Bruselas, Bélgica), se midió la DO450 nm.

Se observó una curva de respuesta a la dosis para el constructo de Nanobody 581 en ADAMTSS humana y para mAb anti-ADAMTS1 humana en ADAMTS1 humana, lo que muestra que el constructo de Nanobody 581 no se une a ADAMTS1 humana.

7.7 Unión a ADAMTS4 y ADAMTS15 humanas

Se estudió la unión a ADAMTS4 y ADAMTS15 humanas en un ELISA de unión (véase la Figura 4B). En resumen, se utilizaron 1 µg/mL de ADAMTS4 humana (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 4307-AD) o ADAMTS15 humana (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. 5149-AD) para recubrir durante la noche en una concentración de 1 µg/mL placas Maxisorp ELISA de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Después del bloqueo de las placas con SuperBlock T20 (PBS) (Thermo Scientific Pierce; n.º cat. 37516) se aplicó una curva de respuesta a la dosis del constructo de Nanobody 581 ("C011400581") o el control positivo mAb anti-ADAMTS4 (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. MAB4307) o el control positivo mAb anti-ADAMTS15 (R&D Systems, Mineápolis, EE. UU.; n.º cat. MAB5149) en la placa recubierta comenzando con 1 µM y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó el Nanobody unido C011400581 con una herramienta anti-Nanobody biotinilada que reconoce el constructo de Nanobody 581 (generado por Ablynx), mientras que los mAb de control positivo se detectaron con un pAb anti-ratón de cabra biotinilado (Jackson Immuno Research; n.º cat. 115-065-062). En ambos casos se utilizó estreptavidinas-HRP como una herramienta de detección secundaria (Thermo Scientific Pierce; n.º cat. 21126). Las placas se visualizaron a continuación añadiendo sTMB (SDT, Bruselas, Bélgica). Todas las diluciones y herramientas de detección se prepararon en diluyente de ensayo (= PBS + 10 % Superblock + 0,05 % Tween20). La reacción colorante se detuvo después de 2,5 minutos añadiendo HCl 1M. Se midió la densidad óptica a 450 nm con 620 nm como longitud de onda de referencia.

7.8 Reactividad cruzada entre especies mediante la determinación de afinidad KinExA

La afinidad del constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) respecto a ADAMTS5 de varias especies se determinó usando KinExA, como se describe en el Ejemplo 7.1. Para todas las especies, se prepararon perlas de PMMA conjugado con ADAMTSS humana y se utilizaron para capturar el constructo de Nanobody 581 libre como se ha descrito anteriormente. El constructo de Nanobody 581 capturado se detectó usando una herramienta anti-Nanobody marcada con AF647 que reconoce el constructo de Nanobody 581 (generado por Ablynx). Los resultados se muestran en la Tabla 7.7

Tabla 7.7 Afinidad del constructo de Nanobody 581 por ADAMTSS de macaco cangrejero, rata, ratón y bovina

ADAMTS5 de especie	K _D (pM)	IC 95 % en K _D (pM)
Macaco cangrejero (n=1)	2,22	0,88-4,76
Rata (n=1)	2,77	1,48 - 5,07
Ratón (n=1)	2,81	0,30 -11,42
Bovina (n=1)	7,66	3,33 -19,88

Ejemplo 8 Potencia en el ensayo de explante humano

Se evaluó la capacidad del constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) para bloquear la degradación del cartílago en un ensayo *ex vivo*, esencialmente como se describe en el Ejemplo 5.2, pero ahora en un ensayo de explante humano. En resumen, se prepararon trocitos frescos de explante de cartílago humano (diámetro 4 mm) a partir de articulaciones de rodilla de ser humano y se incubaron en placas de 96 pocillos en presencia de 10 ng/mL de IL-1α para inducir la degradación del cartílago. Como medida de la degradación del cartílago/agrecano, se detectó la liberación de GAG en el sobrenadante después de 7 días de incubación (37 °C, 7,5 % de CO₂) a través del colorante metacromático azul de 1,9-dimetilmetileno (emisión a 633 nm). Se incluyó sulfato de condroitina como patrón de ensayo. La eficacia se definió por medio de los controles inducidos por IL-10 y OSM sin compuesto y en presencia de MSC2310852A. CRB0017 es un mAb anti-ADAMTS5 que se debe utilizar en un ensayo clínico de Fase I (Rottapharm).

Los resultados se resumen en la Figura 5 y en la Tabla 8.

Tabla 8

Compuesto	Ensayo	CI50 GAG [μ M]
581	Humano	0,0025-0,0079
581	Bovino	0,035
CRB0017	Bovino	0,33

Los nanobodies demuestran una alta potencia y una inhibición del 100 % de la degradación del cartílago (pérdida de GAG) en el ensayo de explante humano. Como se muestra en la Tabla 8, los Nanobodies son por lo menos 10 veces mejores que CRB0017 en el ensayo de explante bovino.

Ejemplo 9 Modulación C2M, C3M y exAGNX1 en un modelo de cocultivo bovino

Se investigó el efecto del constructo de Nanobody 581 ("581" en las figuras) sobre la liberación y el contenido de GAG, C2M (marcador de degradación de colágeno II), C3M (marcador de degradación de colágeno III) y exAGNX1 (marcador de degradación de agregano caracterizado por el neopéptido TEGE) en un sistema de cocultivo bovino. En estos sistemas de cocultivo, se incubaron los explantes de cartílago de una rodilla bovina junto con la membrana sinovial del mismo animal durante 28 días. La mayor liberación de GAG se detectó después de 7 días en cultivo (Figura 6A). Se estudió el constructo de Nanobody 581 en tres concentraciones: 1 nM, 10 nM, 100 nM. La incubación de explantes de cartílago con membrana sinovial resultó en un aumento de la liberación de GAG. El constructo de Nanobody 581 inhibió la liberación de GAG (Figura 6B).

En línea con la liberación de GAG, el análisis del contenido de GAG restante del explante de cartílago (después de la digestión con papaína) reveló una disminución del contenido de GAG después de la co-incubación de explantes con membrana sinovial en comparación con explantes solos (Figura 6C).

Paralelamente al análisis de la liberación de GAG, se midió la liberación de exAGNX1 como marcador específico para la degradación de agregano. El análisis del área bajo la curva (ABC) mostró una fuerte inducción de la liberación de exAGNX1 cuando los explantes de cartílago y la membrana sinovial se incubaron juntos. Además, el constructo de Nanobody 581 inhibió la liberación de exAGNX1 de manera dependiente de la concentración con inhibición completa con 581 100 nM (Figura 7).

Para determinar el efecto del constructo de Nanobody 581 sobre la red de colágeno del cartílago en el sistema de cocultivo, se determinó el C2M como marcador de degradación de colágeno II. A diferencia de los marcadores de degradación de la red de agregano (GAG y exAGNX1), C2M comenzó a aumentar entre el día 14 y 21. La incubación del constructo de Nanobody 581 en el sistema de cocultivo inhibió la liberación de C2M (Figura 8).

Como marcador adicional de la inflamación sinovial, se determinó C3M (es decir, un marcador de degradación de colágeno de tipo III). Un análisis del curso temporal de la liberación de C3M indicó que C3M comenzó a aumentar después de 14 días, alcanzando su máximo alrededor del día 21. El tratamiento con el constructo de Nanobody 581 inhibió C3M en las tres concentraciones (Figura 9).

Ejemplo 10 Inhibición de la actividad agreganasa en NHP

Se evaluó la capacidad del constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11; "C011400581") para inhibir la actividad agreganasa *in vivo* en un modelo en macaco cangrejero, un primate no humano (NHP, por sus siglas en inglés).

En resumen, se administró el constructo de Nanobody 581 a grupos de 3 machos y 3 hembras de macaco cangrejero una vez a la semana por administración subcutánea (s.c.) a niveles posológicos de 6, 30 o 150 mg/kg durante 4 semanas. Se trató un grupo de control concomitante con el vehículo, es decir, Histidina 20 mM, 8 % de sacarosa, 0,01 % de Tween 20 pH 6,0.

Se midió la inhibición de la actividad agreganasa en muestras de suero recogidas en varios puntos temporales, determinando el nivel de fragmentos de degradación de agregano caracterizados por la presencia del neopéptido ARGS en el suero. Todos los animales tratados con el constructo de Nanobody 581 mostraron un perfil similar, es decir, los niveles de ARGS disminuyeron tras la primera dosis y alcanzaron niveles muy bajos aproximadamente o por debajo del límite inferior del intervalo de medición (LLMR, por sus siglas en inglés) del ensayo (0,08 nM) entre 48 horas y 120 horas. Posteriormente, los niveles de ARGS mostraron una disminución máxima sostenida aproximadamente o por debajo del LLMR y en el final del estudio a las 4 semanas no habían vuelto al nivel inicial.

En la Figura 10 se muestra un resumen general de los resultados.

En conclusión, los Nanobodies específicos para ADAMTS5 interaccionan con la diana después de la administración sistémica y modulan potentemente los niveles de neoepítomos ARGS *in vivo* a todos los niveles posológicos estudiados. Además, a diferencia de los mAb de la técnica anterior, no se observaron arritmias patológicas relacionadas con los artículos de prueba. Además, no hubo indicios de ninguna elevación de ST relacionada con la prueba en monos machos y hembras tratados con los Nanobodies en ninguno de los niveles posológicos estudiados.

Ejemplo 11 Inhibición de la degeneración del cartílago

Con el fin de evaluar en más profundidad la capacidad de los Nanobodies y constructos de Nanobodies para inhibir la degeneración del cartílago *in vivo*, se utilizó un modelo de DMM (siglas en inglés de desestabilización del menisco interno) en ratón. En resumen, se desestabilizó quirúrgicamente el menisco interno. El constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo se administró por vía subcutánea 3 días antes de la inducción de la DMM (profiláctico) o administró 3 días después de la inducción de la DMM (terapéutico) en diversas concentraciones. Después de 8 semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron las rodillas. Las rodillas se incluyeron en bloques de parafina, se cortaron y se tiñeron con azul de toluidina. Posteriormente, se calificaron varios parámetros en los cortes, incluida la suma de degeneración del cartílago interno.

Los resultados se muestran en la Figura 11.

Los resultados muestran que existe un beneficio estructural de hasta un 50 % tanto para el tratamiento profiláctico como terapéutico (s.c.) con Nanobodies en el modelo en ratón de DMM.

Ejemplo 12 Beneficio sintomático en el modelo quirúrgico de OA en rata

Con el fin de evaluar la capacidad de Nanobodies para establecer un beneficio sintomático, se utilizó un modelo quirúrgico de OA en rata. En resumen, se trataron las ratas con cirugía ACLT y tMx para inducir OA en el día 0. En el modelo quirúrgico de ACLT y tMx (corte transversal del ligamento cruzado anterior ampliada con una meniscectomía interna) se administró el constructo de Nanobody 581 s.c., en días alternos a partir del día 3 en adelante. Se determinaron semanalmente el beneficio sintomático a través del análisis de la marcha (en un sistema CatWalk) así como la disminución del diámetro de la articulación.

Los resultados se muestran en la Figura 12.

La osteoartritis fue inducida (al día 0) en ratas macho adultas (Lister Hooded; peso corporal promedio de 346 ± 20 g) por cirugía de corte transversal del ligamento cruzado anterior (ACLT) + resección del menisco interno (tMx) en la articulación de la rodilla derecha. El tratamiento con vehículo o artículo de prueba (sc) comenzó el día 3 después de la cirugía y continuó cada dos días hasta el día 42. El grupo control sano no se sometió a intervención quirúrgica, pero recibió vehículo sc en los mismos puntos temporales que los grupos de administración. (A) La perturbación de la marcha en el tiempo se calculó como "% de beneficio respecto al vehículo". Media del grupo "sano + placebo" = 100 % de beneficio. Media del grupo "ACLT tMx + vehículo" = 0 % de beneficio. (B) "Beneficio respecto al vehículo" promedio en todos los puntos temporales investigados después del inicio del tratamiento. Se muestra la media $\pm$ EEM de 14-15 ratas/grupo. * = $p < 0,05$ calculado con ANOVA unidireccional y prueba de Dunnett.

El tratamiento temprano con Nanobodies provocó un beneficio sintomático valioso y significativo dependiente de la dosis durante la OA inducida por ACLT + tMx.

Ejemplo 13 Estudios de toxicidad en macacos cangrejeros

Se realizó un estudio de toxicidad subcrónica de 4 semanas en macacos cangrejeros para obtener información sobre la toxicidad sistémica, tolerabilidad local y farmacología de seguridad de los Nanobodies. El constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo se administró s.c. a grupos de 3 machos y 3 hembras de macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (una vez a la semana por administración subcutánea en la región dorsal con dosis de 6, 30 o 150 mg/kg durante 4 semanas. Se trató un grupo de control concomitante con el vehículo, Histidina 20 mM, 8 % de sacarosa, 0,01 % de Tween 20 pH 6,0.

No se observaron signos de intolerancia local relacionados con los artículos de prueba en ninguno de los niveles posológicos estudiados. No se observaron efectos relacionados con los artículos de prueba sobre el comportamiento, el peso corporal, el consumo de alimentos, los parámetros hemáticos y bioquímicos, la tipificación de los linfocitos, los niveles de CRP, los parámetros de análisis de orina, las funciones oftalmológicas y auditivas y el peso de los órganos de cualquiera de los animales en ningún nivel posológico (datos no mostrados). Ni la inspección macroscópica en la necropsia ni el examen histopatológico revelaron cambios locales o sistémicos en

los órganos que estuvieran relacionados con el tratamiento con el artículo de prueba en ninguno de los animales examinados en ningún nivel posológico estudiado.

Dado que se ha indicado que mAb 12F4 demostró hemorragia endocárdica focal, un aumento dependiente de la dosis de la tensión arterial sin indicios de reversibilidad, así como anomalías de la conductancia cardíaca (elevación del ST y arritmias ventriculares) (Larkin, *et al.*, The highs and lows of translational drug development: Antibody-mediated inhibition of ADAMTS-5 for osteoarthritis disease modification, Conferencia de la OARSI de 2014: París; Renninger *et al.*, Identification of Altered Cardiovascular Function Produced by a Novel Biologic Compound in a Stand Alone Safety Pharmacology Primate Study, en la reunión de la SPS, 2013), se realizó una telemetría exhaustiva no invasiva empleando el sistema EMKA en los animales.

No se observó ninguna influencia relacionada con los artículos de prueba en ninguno de los parámetros telemétricos (empleando el sistema EMKA no invasivo) en ninguno de los animales en ningún nivel posológico. En particular, no se observaron arritmias patológicas y no hubo indicios de ninguna elevación del ST relacionada con los artículos de prueba en monos machos y hembras tratados con Nanobodies en ninguno de los niveles posológicos estudiados (datos no mostrados).

Estos estudios confirman que los Nanobodies específicos de ADAMTS5 pueden considerarse seguros.

Ejemplo 14 Estudio de DMOAD en un modelo de MMT en rata *in vivo*

Con el fin de demostrar la eficacia *in vivo* de los inhibidores de ADAMTS5 fusionados con una molécula de unión a CAP de la invención, se utilizó un modelo de desgarramiento del menisco interno (MMT, por sus siglas en inglés) inducido quirúrgicamente en rata. En resumen, se acopló un Nanobody anti-ADAMTS5 a una molécula de unión a CAP (indicado como constructo de Nanobody C010100954 o constructo de Nanobody 954). Las ratas fueron operadas en una rodilla para inducir síntomas similares a la OA. El tratamiento comenzó 3 días después de la cirugía por inyección IA. Se realizó la histopatología en el día 42 después de la cirugía. Se tomaron muestras de suero intermedias y finales para el análisis exploratorio de biomarcadores. Se determinó el ancho de degeneración del cartílago sustancial total e interno, así como el porcentaje de reducción de degeneración del cartílago. Se utilizaron 20 animales por grupo.

El defecto subcartílago en la tibia interna se muestra en la Figura 13.

Los resultados demuestran que el constructo ADAMTS5-CAP redujo sustancialmente el ancho del cartílago después de 42 días en comparación con el vehículo. Estos resultados sugieren además que

(a) el resto CAP no tiene un impacto negativo en la actividad del Nanobody anti-ADAMTS5;

(b) el resto CAP permite la retención del Nanobody anti-ADAMTS5; y

(c) el Nanobody anti-ADAMTS5 tiene un efecto positivo en el ancho del cartílago, incluso cuando está acoplado a un resto CAP.

Ejemplo 15

Métodos: Se cultivaron explantes de cartílago bovino de cuatro animales (BEX), así como explantes de cartílago humano de ocho articulaciones de rodilla reemplazadas quirúrgicamente (HEX) y de una articulación de rodilla humana sana (hHEX), hasta 21 días en medio solo (w/o), en presencia de citocinas proinflamatorias (oncostatina M [10 ng/mL] + TNF α [20 ng/mL] (O+T) o O+T con un constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) [1 μ M-1 nM] de ejemplo. Se cultivaron conjuntamente cartílago y membrana sinovial de vacas (bCC) y de 4 articulaciones de rodilla humana osteoartítica reemplazadas (hCC) *ex vivo* hasta 28 días en medio solo (w/o), con O+T o O+T más constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) [1 μ M-0,6 nM] de ejemplo. El cartílago se cortó en explantes del mismo tamaño usando un sacabocados de biopsia. Las membranas sinoviales se cortaron en explantes del mismo tamaño (30 mg [$\pm$ 3 mg]) por bisturí. La actividad metabólica de los explantes se evaluó con Alamar Blue. El recambio tisular del cartílago se evaluó utilizando un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para medir biomarcadores bien caracterizados de degradación (huARGS, exAGNxl, C2M) y formación (ProC2) en el medio condicionado. ProC2 y C2M son metabolitos de formación y degradación de colágeno de tipo II, respectivamente, mientras que exAGNxl y huARGS son metabolitos de agregado degradado por ADAMTS-5. Se presentan los valores medios y el error estándar de la media (EEM). Se realizó el análisis estadístico utilizando el análisis de la varianza unidireccional (ANOVA, por sus siglas en inglés) con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn o ANOVA bidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett asumiendo una distribución normal.

Resultados: La actividad metabólica de BEX, HEX y bCC fue estable durante todo el período de cultivo, mientras que la actividad metabólica en hCC y hHEX disminuyó significativamente a partir del día 14 en condiciones tratadas

con O+T en comparación con w/o. En los cultivos estimulados con O+T, los metabolitos de agregano degradado por ADAMTS-5 alcanzaron su máximo en la primera semana del cultivo, excepto en el caso de hHEX en el que huARGS y exAGNxl aumentaron ligeramente más tarde. La degradación del colágeno de tipo II, C2M, por O+T alcanzó su máximo después del día 19. La formación de colágeno de tipo II, Pro-C2, se mantuvo relativamente estable a lo largo de los cultivos, en comparación con el control w/o.

El tratamiento con el constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo en combinación con O+T disminuyó de forma dependiente de la dosis huARGS en el día 5 en BEX (dosis más alta: 8 % de O+T), HEX (dosis más alta: 40% de O+T), bCC (dosis más alta: 10 % de O+T), hCC (dosis más alta: 40 % de O+T), y hHEX (dosis más alta: 24 % de O+T) (Figura 14). La CI50 del constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo en función de la reducción de huARGS estuvo comprendida entre 300nM en BEX y <15nm en HEX, hHEX, bCC y hCC (Figura 14). El efecto del constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo sobre exAGNxl fue similar al de huARGS en los cultivos estudiados. El constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo también redujo el C2M (marcador de degradación de colágeno de tipo II) significativamente y de manera dependiente de la dosis, aunque el efecto fue menor que para los marcadores de degradación de agregano. El constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo no mostró ningún efecto sobre el metabolito de formación de colágeno de tipo II Pro-C2 en ninguna de las condiciones estudiadas.

Conclusiones: Aquí, los autores han mostrado que el constructo de Nanobody 581 (2F3^{SO}-conector 35GS-Alb11) de ejemplo tiene efectos protectores del cartílago debido a su inhibición dependiente de la dosis de la degradación de agregano mediada por ADAMTS-5 y degradación del colágeno de tipo II mediada por MMP en condiciones proinflamatorias de cultivos *ex vivo* de cartílago bovino y humano y en cocultivos de cartílago y membrana sinovial. 2F3^{SO}-conector 35GS-Alb (SEQ ID NO: 129) es una de las realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplo 16 Los presentes constructos de Nanobody superan a los Nanobodies de la técnica anterior

En el documento WO2008/074840 se han descrito varios Nanobodies ADAMTS5. En el presente experimento se realizó una comparación entre los 26 Nanobodies descritos en el documento WO2008/074840 frente a los Nanobodies de la presente invención representados por el Nanobody 2F3^{SO} (2F3*) de ejemplo.

Todos los constructos se estudiaron en un ensayo AlphaLISA, como se describe en el Ejemplo 5.1. Nanobody 2F3^{SO} (2F3*) es el componente básico monovalente que se une a ADAMTS5 de C011400581 (SEQ ID NO: 129). Como control negativo, se utilizó el irrelevante Nanobody IRR00028.

Primero se determinó la actividad de los Nanobodies de la técnica anterior en el AlphaLISA. Los resultados se muestran en la Tabla 16.1.

Tabla 16.1 Actividad de los Nanobodies de la técnica anterior en AlphaLISA

N°	Nombre	Longitud	Longitud de CDR3	Resultados de AlphaLISA
1	36A01	149	17	Bloqueo
2	36A06	147	15	Potenciador
3	36C06	150	17	Potenciador
4	36D06	146	14	Bloqueo
5	36E01	147	15	Potenciador
6	36F01	149	17	Bloqueo
7	37B01	146	15	Potenciador
8	37B06	145	13	Bloqueo
9	37B12	151	16	Potenciador
10	37C06	150	18	Potenciador
11	37C12	150	18	Potenciador
12	37D06	146	15	Potenciador
13	37E06	151	16	Sin actividad
14	37F01	146	15	Potenciador
15	37F12	150	18	Potenciador
16	37G01	150	18	Bloqueo
17	37G06	146	15	Potenciador
18	40A07	151	16	Sin actividad
19	40B08	146	15	Sin actividad
20	40D07	146	14	Sin actividad
21	40E08	147	15	Sin actividad
22	40F07	146	14	Bloqueo
23	40F08	151	19	Sin actividad
24	40G07	146	14	Bloqueo
25	40G08	151	16	Sin actividad
26	40H07	146	14	Sin actividad

Los resultados demuestran que solo 7 Nanobodies de la técnica anterior tienen una actividad de bloqueo. El resto de los Nanobodies de la técnica anterior no tenía actividad ni mejoró la actividad.

5

En una segunda fase de este experimento comparativo, se compararon los Nanobodies de bloqueo frente al Nanobody monovalente 2F3^{SO} (2F3*) de ejemplo.

10

Los valores de CI₅₀ de los constructos de Nanobody se enumeran en la Tabla 16.2. El factor de diferencia con el Nanobody monovalente 2F3^{SO} (2F3*) de ejemplo también se indica para facilitar la comparación.

Tabla 16.2 Potencias de los constructos de Nanobody de la técnica anterior frente al Nanobody 2F3SO (2F3*) según se determina en AlphaLISA

ID Exp	ID Nb	CI50 [nM]	Factor de diferencia frente a 2F3** (2F3*)
1	2F3** (2F3*)	2,0E-10 [1,2E-10; 3,1E-10]	-
	36D06	1,4E-09 [8,5E-10; 3,6E-09]	7x
	36F01	7,0E-09 [2,3E-09]	35x
	36B06	2,2E-09 [1,4E-09; 3,7E-09]	11x
2	2F3** (2F3*)	2,7E-10 [2,2E-10; 3,4E-10]	-
	37G01	7,3E-09 [5,2E-09; 1,2E-08]	27x
3	2F3** (2F3*)	1,9E-10 [1,5E-10; 2,3E-10]	-
	40F07	1,9E-09 [1,4E-09; 2,8E-09]	10x
	40G07	1,7E-09 [1,2E-09; 2,4E-09]	9x
4	2F3** (2F3*)	4,4E-10 [3,6E-10; 5,3E-10]	-
	C011400581	3,5E-10 [2,8E-10; 4,4E-10]	-
	36A01	inhibición parcial	-

Se puede concluir que los constructos de Nanobody de la presente invención superaron a los Nanobodies ADAMTS5 de la técnica anterior.

5

Tabla A-1 Nombre y descripción corta ("ID"), SEQ ID NO:s ("SEQ") y secuencias de aminoácidos de Nanobodies monovalentes y multivalentes anti-ADAMTSS

ID	SEQ	Secuencia
2A02	5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRRITFSSIVMAWFRQAPGKEREFVAAISRSGDSTYYYDSLEGRFTIS RDNAKNTVHLQMNSLKPEDTAVYICAASRAPSFRTIDAINYDYWGQGTLVTVSS
2A12	1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITFSSYAMGWFRQAPGKERDFVAGISRSGRTYYVDSVKGRFTIS RDSAKNTVYLMNRLKPEDTAVYYCAADLDPNRIFSRDEAAYWGQGTLVTVSS
2C10	9	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTTFSPYYMGWFRQAPGKERDFVAAITRSRGTTYLDSTEGRFTIS RDNAKNTMYLQMNSLNPEDTAVYYCAAGRSPGDPSTRTLYEYWGQGTLVTVSS
2D07	6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSFSGPGRITFARYAMGWFRQAPGKNRDFITGISGSGDSTYYVYPMKDRFT ISRDNAKNMVYLMNALKPEDTAVYYCAADREINRIANDKELDFWGQGTLVTVSS
2D12	4	EVQLVESGGGLVQAGDSRLRLSCAASGRITFSTYFVGWFRQAPGKERDFVAAISRNGARTYYYSVAGLFTIS RDNAKNTVYLMSSSLKPEDTAVYYCAAARISPSDPSNEDGYDYWGQGTLVTVSS

ES 3 002 733 T3

ID	SEQ	Secuencia
2F03	2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFR LAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTIS RDSAKNTVY LHMNRLKPEDTAVYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGT LVTVSS
2G01	7	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTTFSSYAMGWFRQAPGKERAFVATIWSGGLTVYADSAKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA EAVGTYTTPDGWTYWGQGT LVTVSS
3B02	16	EVQLVESGGGFVQAGGSLRLSCVASRRTISSGTMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSSGMPYYLDSVMDRFTIS RDNAKNTVSLQMNSLQPEDTAVYYCAADRS AFRDPSFDVNYEYWGRT LVTVSS
3B03	13	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGSDVVVNDMGWYRQAPGKQREL VADITGGRTNYADSVKGRFTISR DNVKN TVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAQVGDSDDDVWYAYWGQGT LVTVSS
3D01	10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAPSGFTFSPYYMGWFRQAPGKERDFVAAISRSGTTYLDSTEGRFTIS RDNANDTVYLQMNSLNPEDTAVYYCAAGRSPGDPSRTYLYDYWGQGT LVTVSS
3D02	11	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCATSGFTFSPYYMGWFRQAPGKERDFVAAISWSRGILYYTDSTEGRFTIS RDNAKNTMYLQMDNLNPEDTAVYYCAASRSPGDPSRTYLYDYWGQGT LVTVSS
7B11	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSNVMGWYRQAPGKQRELVA AIISSGRTNYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEVDAGIYAYGYWGQGT LVTVSS
9A05	17	EVQLVESGGGFVQAGGSLRLSCAASRRTISSGTMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSSGITFPDSVEGRFTIS GDNAKNTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAADRSALRDPSFEVNYEYWGRT LVTVSS
9D03	3	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGS AVSVNAMAWYRQAPGKQRFVAGISR SAGRTYYTDSVKDRFTIA RDSAKNTVYLQMNRLKPEDTAVYYCAADLDPNRIFSRDEAAYWGQGT LVTVSS

ES 3 002 733 T3

ID	SEQ	Secuencia
9D09	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVSAISWNTFTTYYVDSVKDRFTVS RDNAKNTLYLRMNSLKPEDTAVYYCAAAGGSPRQHEPEYRVRWGQGTLLTVSS
9D10	12	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRALSSSIMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGRAYYADVSDFEKGRF TISRDNKGKNTVNLQMKGLKPEDTAVYYCAAALAIPTVMS PHEYPYWGQGTLLTVSS
11B06	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFRRNAMGWFRQAPGKERELLAGINWSGGTTYVDSVKGRFTIS RDNAKNTVDLQMISSPKPEDTAVYYCAADGDIGTLVNDENPRYWGQGTLLTVSS
13E02	18	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIFSIDAMGWYRQAPGKERELVASVTTGASPNYGDVSGRFTASR DRAKNALYLQMNLSLKPEDTAVYYCNLIMTIPGGSQIMYWGQGTLLTVSS
3F04	19	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASGRYPMAWFRQAPGKEREFVAGVSWGGDRITYYADSVQGRFTVSRDYA KNTLYLQMNLSLKPEDAAYYYCAGDPWGRLFRVKDNYSDWGQGTLLTVSS
constructo 11B06:N52	049 117	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFRRNAMGWFRQAPGKERELLAGISWSGGTTYVDSVKGRFTIS RDNAKNTVDLQMISSPKPEDTAVYYCAADGDIGTLVNDENPRYWGQGTLLTVSS
constructo 3F04:N100 fQ	093 116	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASGRYPMAWFRQAPGKEREFVAGVSWGGDRITYYADSVQGRFTVSRDYA KNTLYLQMNLSLKPEDAAYYYCAGDPWGRLFRVKDQYSDWGQGTLLTVSS
constructo 004 2A12-Alb	120	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKERDFVAGISRSAGRTYYVDSVKGRFTIS RDSAKNTVYLYQMNRLKPEDTAVYYCAADLDENRIFSRDEAAYWGQGTLLTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLTYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS
constructo 005 2D7-Alb	121	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSFSGPGRTFARYAMGWFRQAPGKNRDFITGISGSGDSTYYVYPMKDRFT ISRDNAKNTVYLYQMNALKPEDTAVYYCAADREINRIANDKELDFWGQGTLLTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLTYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS

ES 3 002 733 T3

ID	SEQ	Secuencia
constructo 006 2F3-Alb	122	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFR LAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTTISRDSAKNTVY LHMNRLKPEDTAVYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
constructo 069 049-Alb	123	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFRNAMGWFRQAPGKERELLAGISWSGGTTYVDSVKGRFTTISRDNAKNTVDLQMISPKPEDTAVYYCAADGDIGTLVNDENPRYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
constructo 070 9D3-Alb	124	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGSAVSVNAMAWYRQAPGKQDFVAGISRAGRTYYTDSVKDRFTTISRDSAKNTVY LQMNRLKPEDTAVYYCAADLDPNRIFSRDEAAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
constructo 071 3B2-Alb	125	EVQLVESGGGFVQAGGSLRLSCVASRRTISSGTMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSGMPYYLDSVMDRFTTISRDNAKNTVSLQMNSLQPEDTAVYYCAADRSAPRDPSSFDVNYEYWCGRGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
constructo 129 2F3-093-Alb	126	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFR LAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTTISRDSAKNTVY LHMNRLKPEDTAVYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASGRYPMAWFRQAPGKEREFVAGVSWGGDRTYYADSVQGRFTVSRDYAKNTLYLQMNSLKPEDAAVYYCAGDPWGRLFRVKDQYSDWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
constructo 130 049-093-Alb	127	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFRNAMGWFRQAPGKERELLAGISWSGGTTYVDSVKGRFTTISRDNAKNTVDLQMISPKPEDTAVYYCAADGDIGTLVNDENPRYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASGRYPMAWFRQAPGKEREFVAGVSWGGDRTYYADSVQGRFTVSRDYAKNTLYLQMNSLKPEDAAVYYCAGDPWGRLFRVKDQYSDWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
constructo 131 9D3-093-A1b	128	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGSAVSVNAMAWYRQAPGKQDFVAGISRAGRTYYTDSVKDRFTTISRDSAKNTVY LQMNRLKPEDTAVYYCAADLDPNRIFSRDEAAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASGRYPMAWFRQAPGKEREFVAGVSWGGDRTYYADSVQGRFTVSRDYAKNTLYLQMNSLKPEDAAVYYCAGDPWGRLFRVKDQYSDWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS

ID	SEQ	Secuencia
constructo 577=581 2F3*-Alb	129	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLVADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGTLTVSSA
constructo 579 2F3*- 093*-Alb	130	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRYPMAWFRQAPGKEREFVAGVSWGGDRT YYADSVKGRFTISRYSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAGDPFGRLFRVKDQYSDWGQGTLLVTVSSGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGTLTV VSSA

* versión SO (secuencia optimizada)

Tabla A-2: Secuencias para CDR y de almacén, más combinaciones preferidas según lo dispuesto en la fórmula I, concretamente, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (el siguiente término: "ID" se refiere a la SEQ ID NO dada)

ID	Nanobody	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
1	02A12	72	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG	2	GRTFSSY AMG	85	WFRQAPGK ERDFVA	36	GISRSAG RTY	95	YVDSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNRIKPEDTAVYYCAA	54	DLDPNRIFSRDEAA Y	114	WGQGTLLVTVSS
2	02F03	72	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG	2	GRTVSSY AMG	86	WFRQAPGK ERDFVA	37	GISRSAE RTY	96	YVDSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNRIKPEDTAVYYCAA	55	DLDPNRIFSREEYAY Y	114	WGQGTLLVTVSS
3	09D03	72	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG	2	GSAVSVN AMA	87	WYRQAPGK QRDFVA	36	GISRSAG RTY	97	YVDSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNRIKPEDTAVYYCAA	54	DLDPNRIFSRDEAA Y	114	WGQGTLLVTVSS
4	02D12	72	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG	2	GRTFSTY FVG	85	WFRQAPGK ERDFVA	38	AISSNGARTY Y	98	YVDSVAGLFTISRDNKNTVYLQMNRIKPEDTAVYYCAA	56	ARISPSDPSNEDGY DY	114	WGQGTLLVTVSS
5	02A02	72	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG	2	RRTFSSY VMA	88	WFRQAPGK ERDFVA	39	AISSRSGD STY	99	YVDSLEGRFTISRDNKNTVYLQMNRIKPEDTAVYYCAA	57	SRAPSFRTIDAINY YDY	114	WGQGTLLVTVSS
6	02D07	76	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTVSSYAMGWFRQAPGKEREFVAGISRSAERTYYVDSLKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLDPNRIFSREEYAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG	25	GPGRTPARYAM G	89	WFRQAPGK NRDFTT	40	GISGSGD STY	100	YVDSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNRIKPEDTAVYYCAA	58	DREINRIANDKELD F	114	WGQGTLLVTVSS
7	02G01			2	GRTTFSS YAMG			41	TIWSGGL TV			5	EAVGTYTYP DGWTY		

ES 3 002 733 T3

ID	Nanobody	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
		77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS				90 WFRQAPGK EERFVA				101 YADSAKGRFTISRDNKAKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA				114 WQGGTL VTVSS	
8	11B06	77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		2 7	GLTFRRN AMG	91 WFRQAPGK ERRFTA		42	GINWSG GTTY	102 YVDSVKGRFTISRDNKAKNTV DLQMISPKPEDTAVYYCAA		60	DGDIGTLVNDENFR Y	114 WQGGTL VTVSS	
11 7	49 11B06: N52S	77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		2 7	GLTFRRN AMG	91 WFRQAPGK EBRELLA		11 9	GISWSG GTTY	102 YVDSVKGRFTISRDNKAKNTV DLQMISPKPEDTAVYYCAA		60	DGDIGTLVNDENFR Y	114 WQGGTL VTVSS	
9	02C10	77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		2 8	GFTFSPY YMG	85 WFRQAPGK ERDEVA		43	AITRSRG TTY	103 YLDSVTEGRFTISRDNKAKNTM YLQMNSTNPEDTAVYYCAA		61	GRSPGDPSPRTYLYE Y	114 WQGGTL VTVSS	
10	03D01	77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		2 8	GFTFSPY YMG	85 WFRQAPGK ERRFVA		44	AISRSRG TTY	104 YLDSVTEGRFTISRDNKAKNTV YLQMNSTNPEDTAVYYCAA		62	GRSPGDPSPRTYLYD Y	114 WQGGTL VTVSS	
11	03D02	77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		2 8	GFTFSPY YMG	85 WFRQAPGK ERDEVA		45	AISWSRG ILY	105 YLDSVTEGRFTISRDNKAKNTM YLQMNSTNPEDTAVYYCAA		63	SRSPGDPSPRTYLYD Y	114 WQGGTL VTVSS	
12	09D10	77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		2 9	GRALSSS IMG	88 WFRQAPGK ERRFVA		46	AITWSGGRAY YAD	106 VSDPEKGRFTISRDNKAKNTV NLQMRGLKPEDTAVYYCAA		64	ALAIPTVMSPEHYE Y	114 WQGGTL VTVSS	
13	03B03	80 EVQIVFSSGGGGLV PGGSLRLSCAAS		3 0	GSDVWN DMG	92 WYRQAPGK ORREVA		47	DITTGGR TN	107 YADSVKGRFTISRDNKAKNTV YLQMNSTLPEDTAVYYCAA		6 5	QVGDSDDD VWYAY	114 WQGGTL VTVSS	
14	07B11	77 EVQIVFSSGGGGLV PGGSLRLSCAAS		3 1	GSIFSINV MG	92 WYRQAPGK ORREVA		48	AIISGGRT N	108 YADSVKGRFTISRDNKAKNTV YLQMNSTLPEDTAVYYCAA		6 6	EVDAGIYAY GY	114 WQGGTL VTVSS	
15	09D09	77 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		3 2	GLTFSSY TMG	93 WFRQAPGK ERRFVS		49	AISWNTF TTY	109 YVDSVKGRFTISRDNKAKNTT YLQMNSTLPEDTAVYYCAA		67	AGGSPRQHEPYEYR V	114 WQGGTL VTVSS	
16	03B02	81 EVQIVFSSGGGGLV AGGSRLRLSCAAS		3 3	RRTISSG TMG	88 WFRQAPGK ERREVA		50	AIRWSSG MPY	110 YLDSVMDRFTISRDNKAKNTV SLQMNSTLPEDTAVYYCAA		68	DRSAFRDPSFDVNY EY	115 WGRGTL VTVSS	

ID	Nanobody	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
17	09A05	82 EVQIVSSGGGPFV AGGSLALSCAAS	3 3	RRTISSG TMG	88 WFRQAPGK EREFVA	51	AIRWSSG ITF	111 YPDSVEGRFTISGDNKNTV SLQMNSLKPEDIAVYTCAG	69 DRSALRDPSEFVNY EY	115 WSGRTL VTVSS					
18	13E02	83 EVQIVSSGGGPFV AGGSLALSCAAS	3 4	GSIFSIDA MG	94 WYRQAPGK ERELEVA	52	SVTTGAS PN	112 YGDSVTGRFTASRDRAKNAL YLQMNSLKPEDIAVYTCAG	70 IMTIPGGSQI MY	114 WSGRTL VTVSS					
19	03F04	84 EVQIVSSGGGPFV AGGSLALSCAAS	3 5	GRYPMA	88 WFRQAPGK EREFVA	53	GVSWGG DRTY	113 YADSVQGRFTVSRDYAKNTL YLQMNSLKPEDIAVYTCAG	71 DPWGRLFRVKDNYS D	114 WSGRTL VTVSS					
116	93 (3F04 N100fQ)	84 EVQIVSSGGGPFV AGGSLALSCAAS	3 5	GRYPMA	88 WFRQAPGK EREFVA	53	GVSWGG DRTY	113 YADSVQGRFTVSRDYAKNTL YLQMNSLKPEDIAVYTCAG	118 DPWGRLFRVKDQYS D	114 WSGRTL VTVSS					

Tabla B Secuencias diversas de aminoácidos: Nombre y descripción corta ("ID"), SEQ ID NO:s ("SEQ") y secuencias de aminoácidos ("secuencias")

especie	SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
ADAM-TS5 Q9UNA0-1 humana	149	MIICGASILLTCAFKLPLAAYCAACCPAQDIFACQPTAFAAAAGPRRRQQTTEVQGEAEPTTTPHDTAQDPRSKQIVQCT DQIVSGGGGVQYIYVACORPELILDLERLQSVCTACLPAPACCTPAAATGPHDSHCFTROTVDGSPRSLAVFDTCCCLDQ FFRYCHARYTTCCLLQGPAPPEPCIRVYDQCSARIIEVYTPRQESFEALPDRACGCTDASTQAKENAPAHNPSCLR AATAAQITIGQALSPACGGGQGTWRRRRRLSTFRARQVEELIVADAEMADATTCQGLHYTCTLASAKNTYSHASTE DEIRLAVYGVVLTCKKSLGVSNAAEILEHFORKQGHQQLVSDDELLAIDAAIDATREBLOGPESGQULGNADVO TLDNPARSGAVFDGLHAATVVAHPICHLGLSDNDRKGLATLCTPHHPIANNHLEQDANKWAKTSAFTFN FDDGKQGLDLPKQGLGHPPIPGQYATQDQNYIEGHEVWQNGVAVKALINDAVRQDQMMITPELDEAVG TPDGRICLQGVDRRIENITYLSTRKGLQGLVYAWQGGELSDCTCALPATTACNADAPHHNRCTGCKEATVRRG LAKPCHNGKSHPHLQCLAKTQSDAKGKIEVWPKYAHVLAQVCKILDRARNGGEEVVFAPKVLGHLQKLY SLSVYVRKQVREPGDGLIKELQTEKQGVGSDNSFCIKLWSTNNKKEGGLLVVRIPLAALHVRKQIEKLDQK FTATLAKAAAGDTLNGKNISTSETLIDRLQNTYSKSHADELHGMQSAFPELLVQLLADNYKPLDQPY STFVPEKSTPAVNSVLEHGSNRYGSHLSQDQWVCPWLAGCKPDLQCAIKLVQDQDQKALATDCLSQKSAFTQ CLLHKO
bovina (residuos AA 1-626)	150	MIICGRMIMLCALRLPFAAGCTPAAATAGQVYACQPRARVAAAAGPRCPHCPACQEPPTTQWDFHLPQPRSCATVQ NTPDGLSICGRVQYIYVAFRRNCLILIRDSVCAAGLVPAKNTINATTPRRKQDEYHPTVGNRPRFAYVWGLCL DQKAVHARATPIQMLDRGNAPASGPARVYGGESAKILEVYFRGCHPKALPKKTCILPHASPEGRAPFPAPSKP DGRRLAPQZTPQQLAPLQDQSGQFRTWRRRASTAPAPQVTLIVADASKARMVGETQHYILCTLAGTANKYSH ACTONHILRVVVOAVLSDHDKSCVSDNATTLKAPCHWQHQVNGQGDDEEENYDAALGETREBLOGHNSCTTCM ADYSTCCPERSCAVIEDDGLHRAFTVAHETGUELLHEDCKFCEENFGSDCKRLAGGCLTSDACKPWHCTCA TITEFLDSHGLILDLPRKQIPGPEELPGQYDALQQCLITFGPEYGVCPGHVCAALLQAVVRQQQVCLINKIP AMDTFQGGHLLDQCKVGHCTFYNYLISDNNWLVGSRQDQDRSCGGSVQGEAYRICKNPAFRNNCKVCDKPAI VPSLVVTCPEHNRKSHFP
rata (residuos AA 1-619)	151	

ES 3 002 733 T3

[illegible]

[illegible]

Tabla C: Diversas secuencias conectoras ("ID" se refiere a la SEQ ID NO tal como se usa en el presente documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
A3	158	AAA
conector 5GS	159	GGGGS
conector 7GS	160	SGGSGGS
conector 8GS	161	GGGGGGGS
conector 9GS	162	GGGGSGGGS
conector 10GS	163	GGGGSGGGS
conector 15GS	164	GGGGSGGGGSGGGGS
conector 18GS	165	GGGGSGGGGSGGGGGGS
conector 20GS	166	GGGGSGGGGSGGGSGGGGS
conector 25GS	167	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGGS
conector 30GS	168	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
conector 35GS	169	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
conector 40GS	170	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
bisagra G1	171	EPKSCDKTHTCPPCP
bisagra 9GS-G1	172	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
región bisagra larga superior de llama	173	EPKTPKPQPAAA
bisagra G3	174	ELKTPGLDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCFRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

Tabla D: Secuencias ISVD que se unen a albúmina sérica ("ID" se refiere a la SEQ ID NO tal como se utiliza en el presente documento), incluidas las secuencias CDR

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Alb8	131	EVQLVESGGGLVQPQNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSS
Alb23	132	EVQLLESGGGLVQPQGSRLSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSS
Alb129	133	EVQLVESGGGVVQPQNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSA
Alb132	134	EVQLVESGGGVVQPQGSRLSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSA
Alb11	135	EVQLVESGGGLVQPQNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSS
Alb11 (S112K)-A	136	EVQLVESGGGLVQPQNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTILVKVSSA
Alb82	137	EVQLVESGGGVVQPQNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSS
Alb82-A	138	EVQLVESGGGVVQPQNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSA

ES 3 002 733 T3

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Alb82-AA	139	EVQLVESGGGVVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSAA
Alb82-AAA	140	EVQLVESGGGVVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSAAA
Alb82-G	141	EVQLVESGGGVVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSG
Alb82-GG	142	EVQLVESGGGVVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSGG
Alb82-GGG	143	EVQLVESGGGVVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSGGG
Alb92	144	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSS
Alb223	145	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSA
ALB CDR1	146	SFGMS
ALB CDR2	147	SISGSGSDTLYADSVKG
ALB CDR3	148	GGSLSR

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende al menos 1 dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que une una desintegrina A y metaloproteinasa con motivo trombospondina 5 (ADAMTS5),
5 en donde dicho ISVD que se une a ADAMTS5 comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente) y 4 regiones de armazón (FR1 a FR4, respectivamente), en las que CDR1 es la SEQ ID NO: 21, CDR2 es la SEQ ID NO: 37 y CDR3 es la SEQ ID NO: 55, y en las que
10 (i) FR1 es la SEQ ID NO: 72, FR2 es la SEQ ID NO: 86, FR3 es la SEQ ID NO: 96 y FR4 es la SEQ ID NO: 114, o
(ii) FR1 tiene la secuencia de aminoácidos DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS, FR2 es la SEQ ID NO: 88, FR3 tiene la secuencia de aminoácidos YVDSLKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRP EDTALYYCAA, y FR4 es la SEQ ID NO: 114.
- 15 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos 2 ISVD, en donde al menos 1 ISVD se une específicamente a ADAMTS5.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichos al menos 2 ISVD se unen específicamente a ADAMTS5.
20
4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un ISVD que se une a albúmina sérica.
5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho polipéptido tiene una estabilidad de al menos 7 días en líquido sinovial (SF) a 37 °C.
25
6. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de un 100 % con cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 122, 126, 129 o 130.
- 30 7. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de un 100 % con la SEQ ID NO: 129.
8. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento.
- 35 9. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento o prevención de un síntoma de una enfermedad asociada con ADAMTS5 seleccionada del grupo que consiste en artropatías, condrodistrofias, enfermedad artrítica, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis psoriásica, rotura o desprendimiento traumáticos, acondroplasia, costochondritis, displasia espondiloepimetáfisaria, hernia de disco vertebral, enfermedad de degeneración del disco lumbar, enfermedad degenerativa de las articulaciones, policondritis recurrente, osteocondritis disecante y agrecanopatías.
40
10. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento o prevención de un síntoma de la osteoartritis.
- 45 11. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y al menos un portador, diluyente o excipiente adecuado.

Figura 1

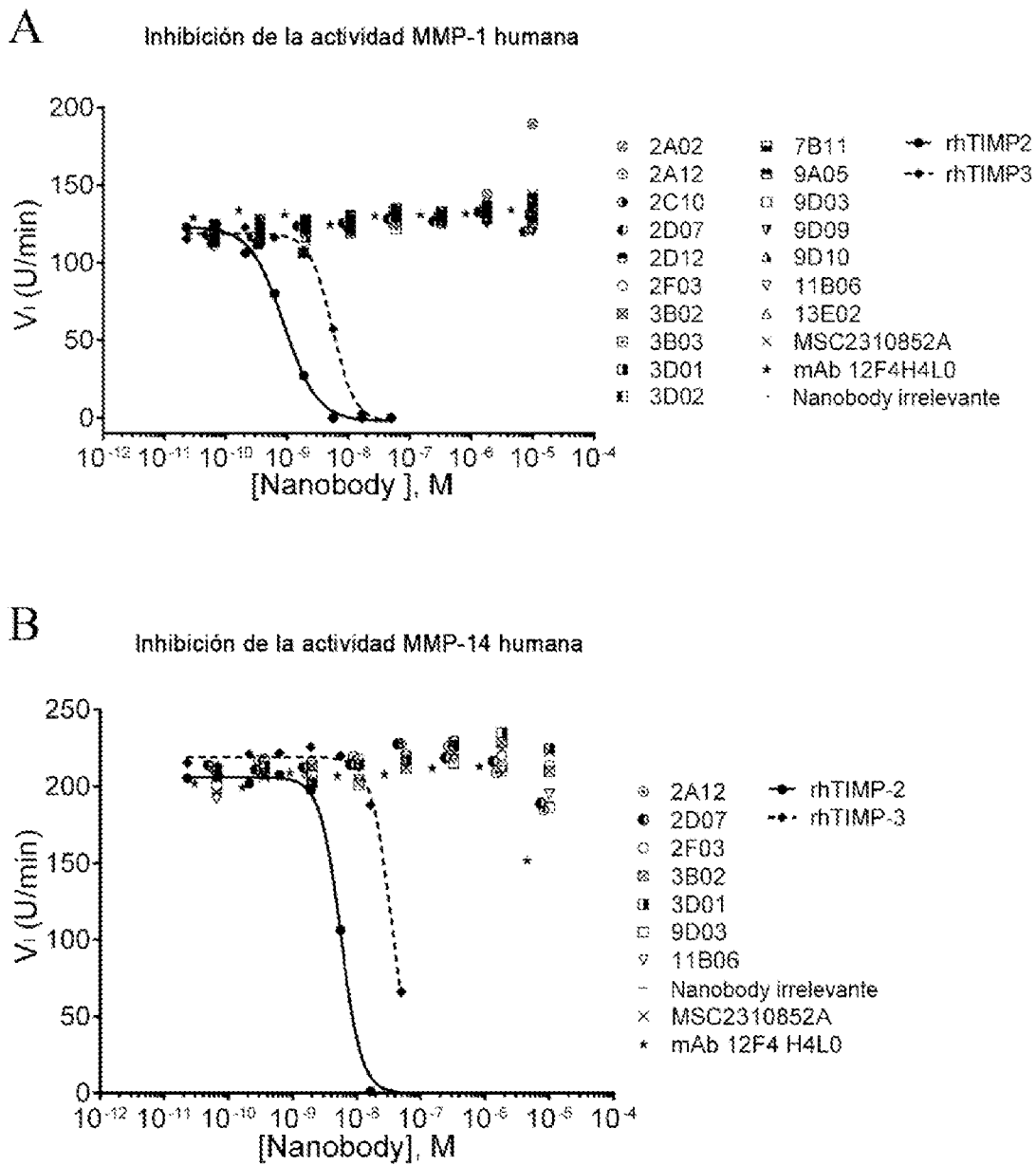


Figura 2

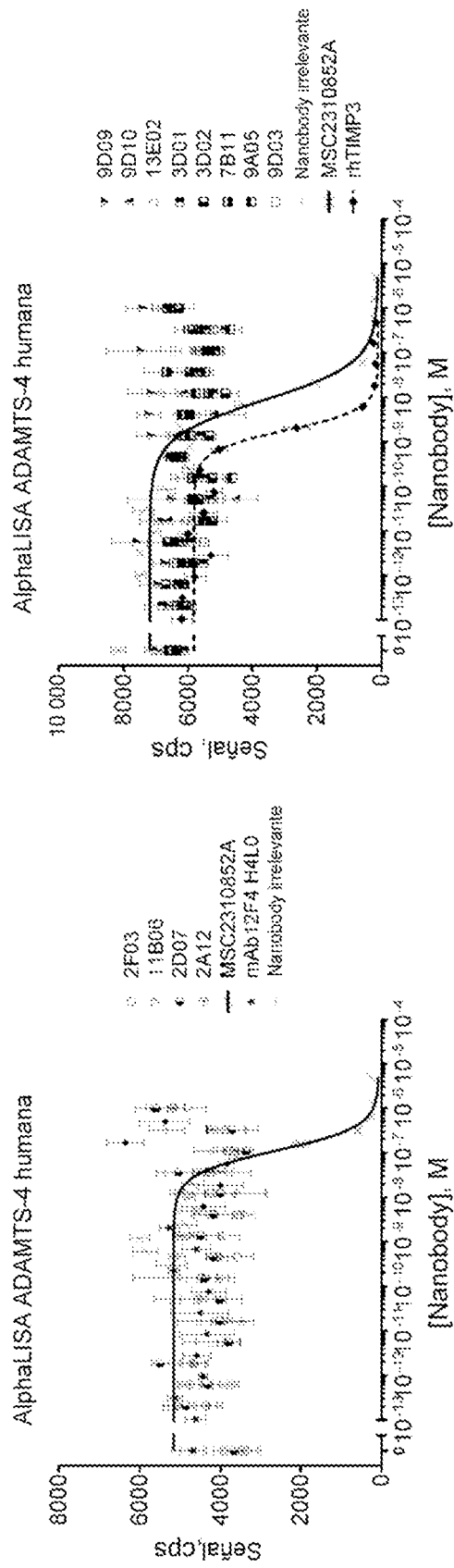


Figura 3

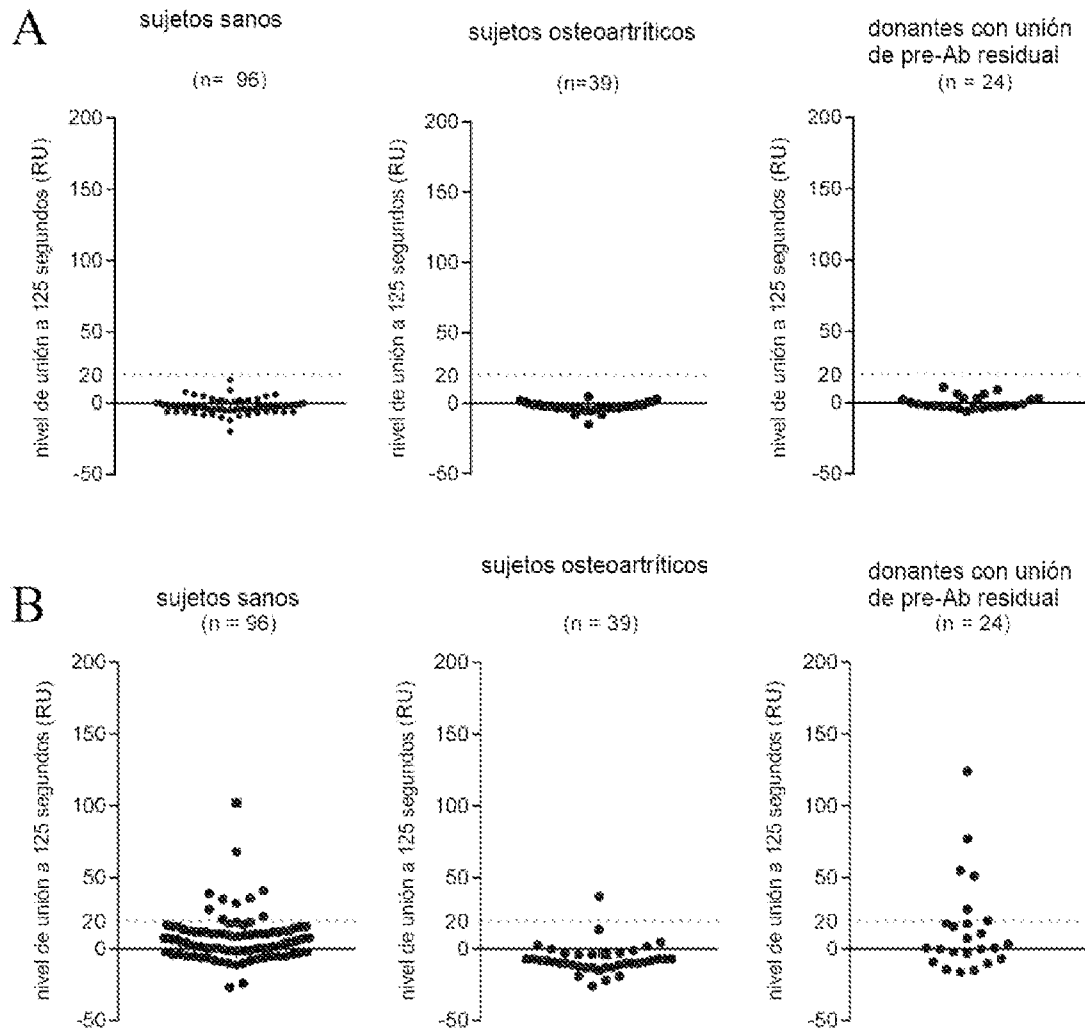
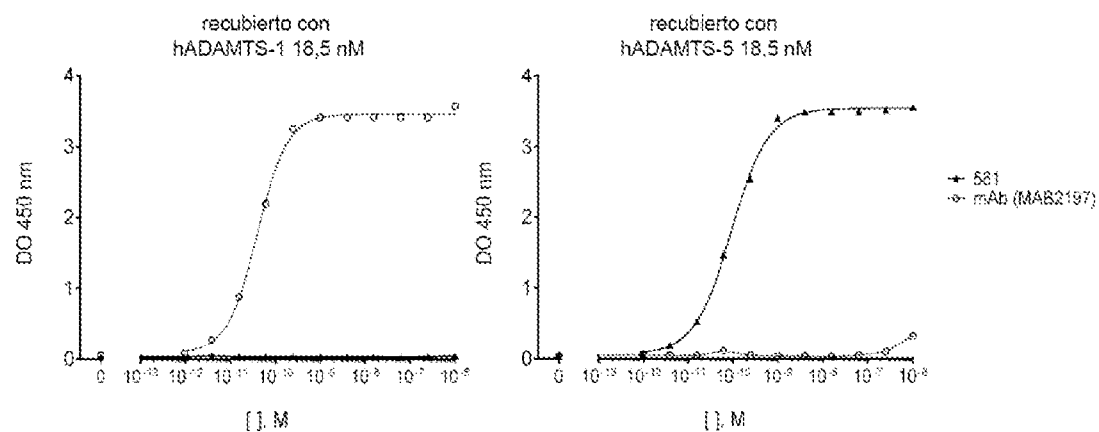


Figura 4

A



B

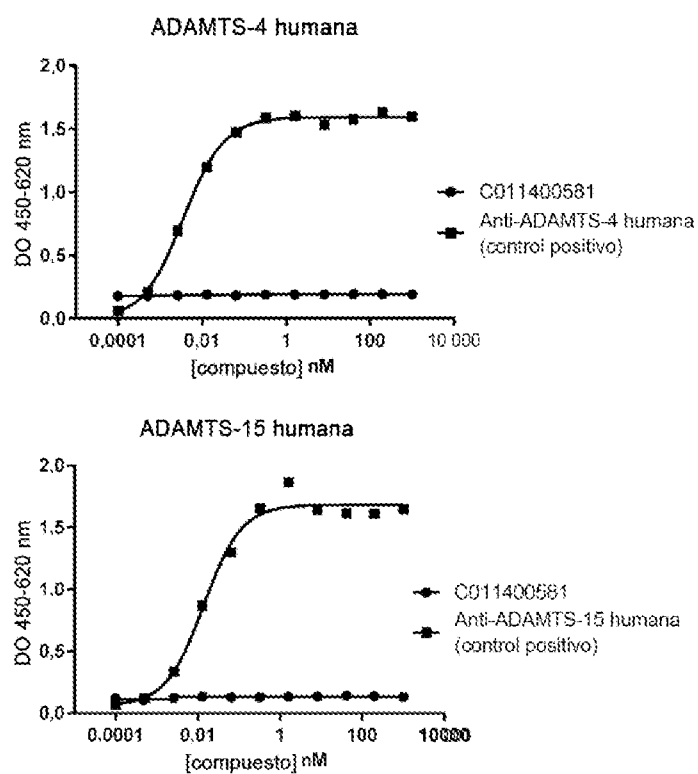


Figura 5

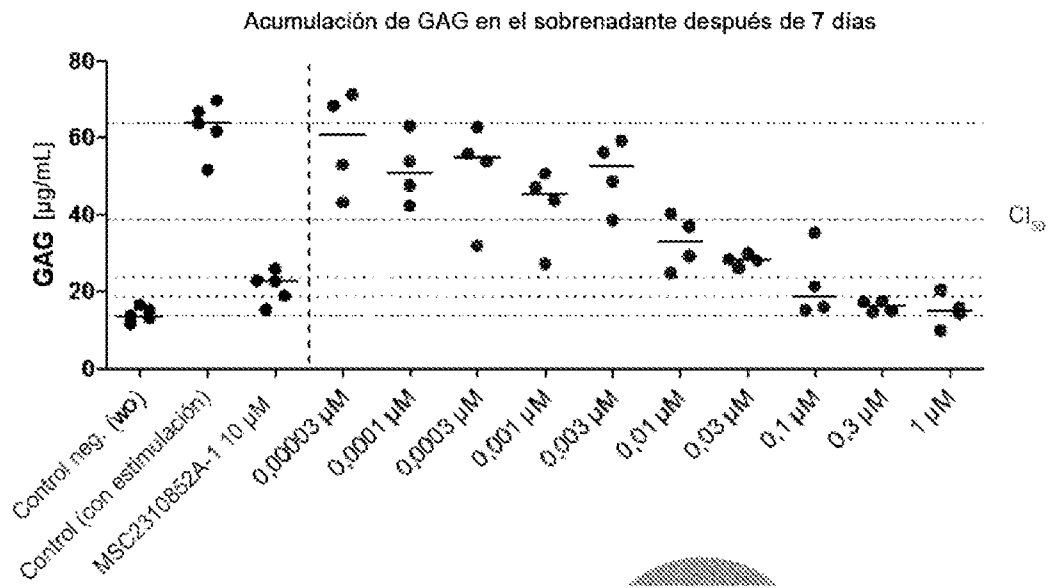


Figura 6

A)

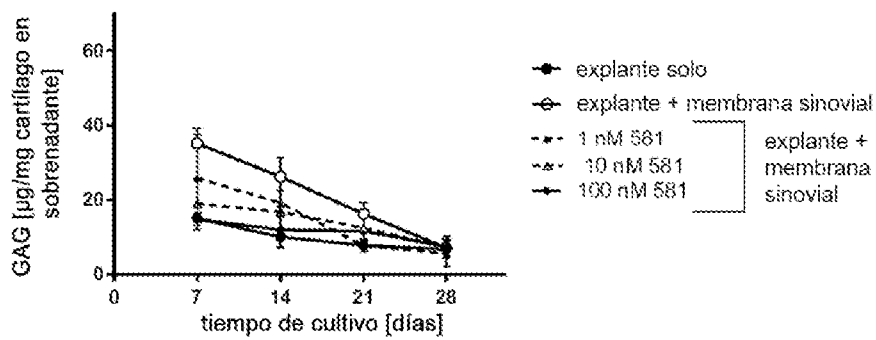
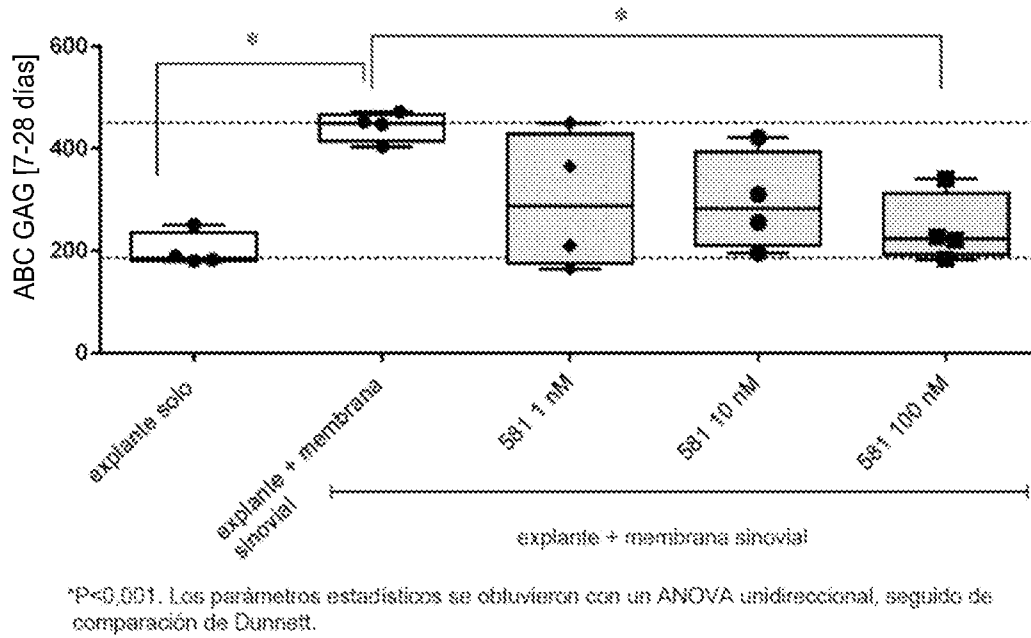


Figura 6 (continuación)

B)



C)

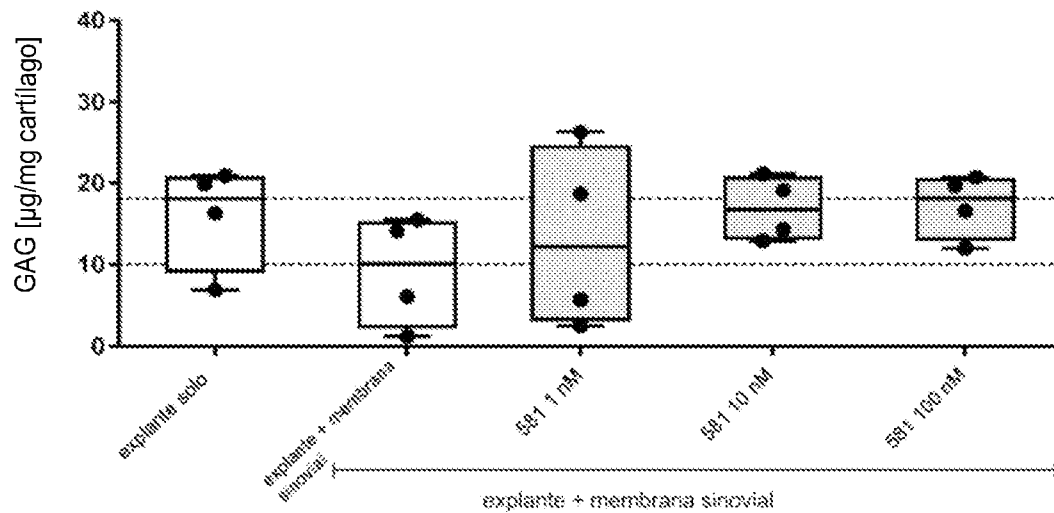


Figura 7

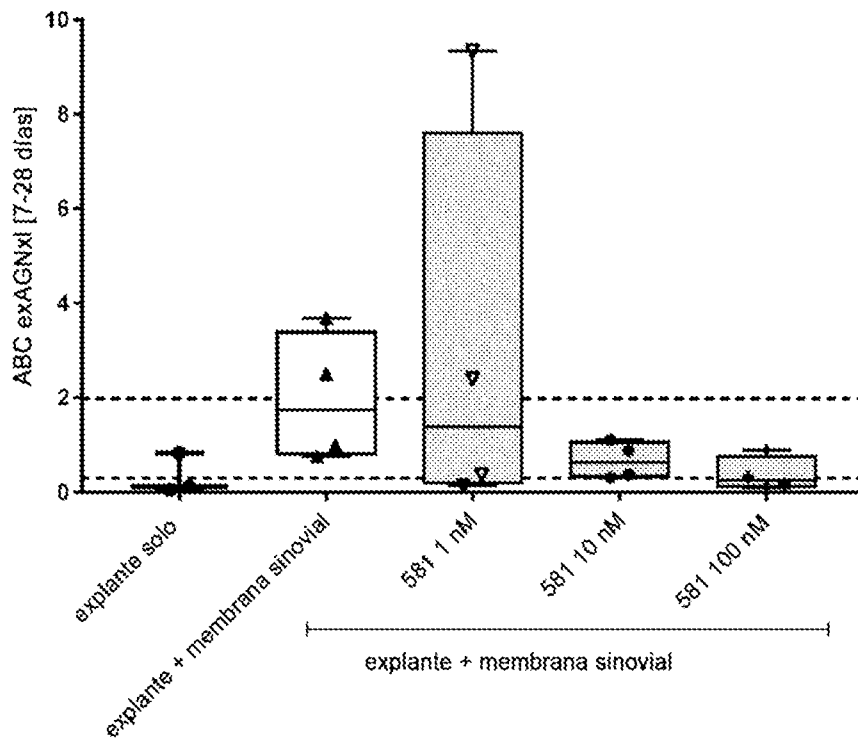


Figura 8

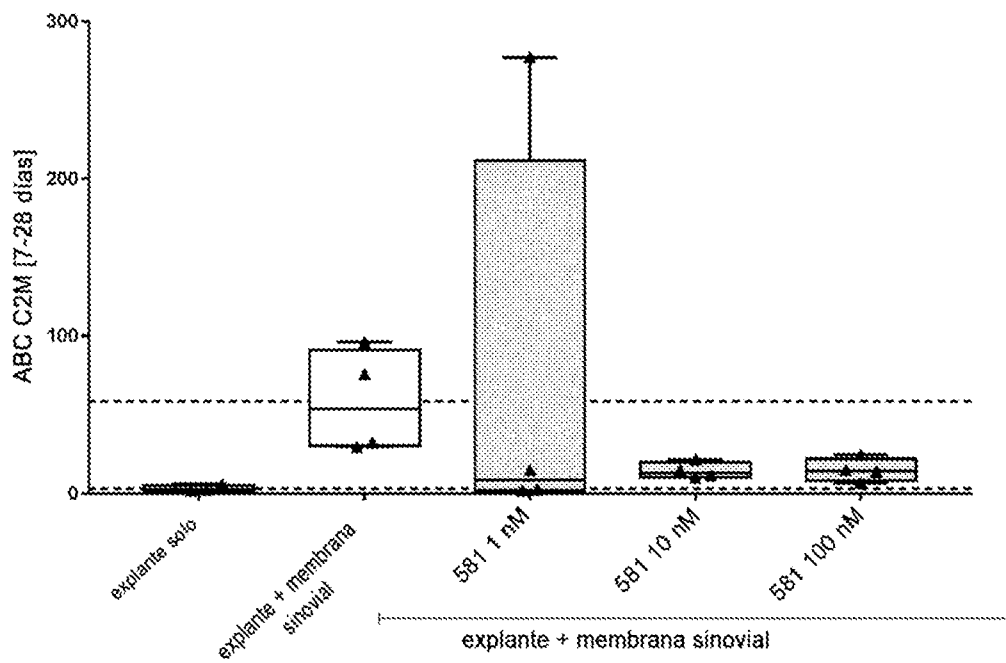
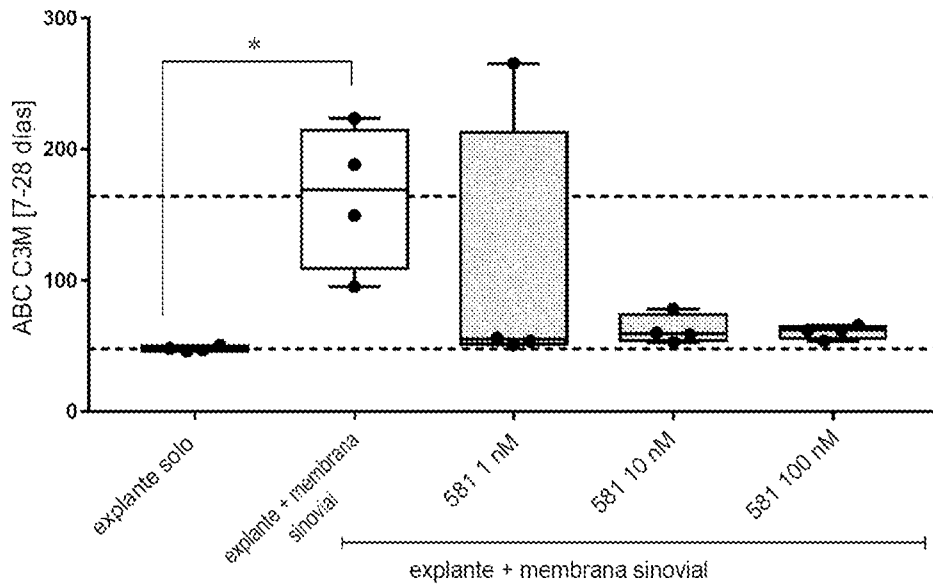


Figura 9



* $P < 0,001$. Los parámetros estadísticos se obtuvieron con un ANOVA unidireccional, seguido de comparación de Dunnett.

Figura 10

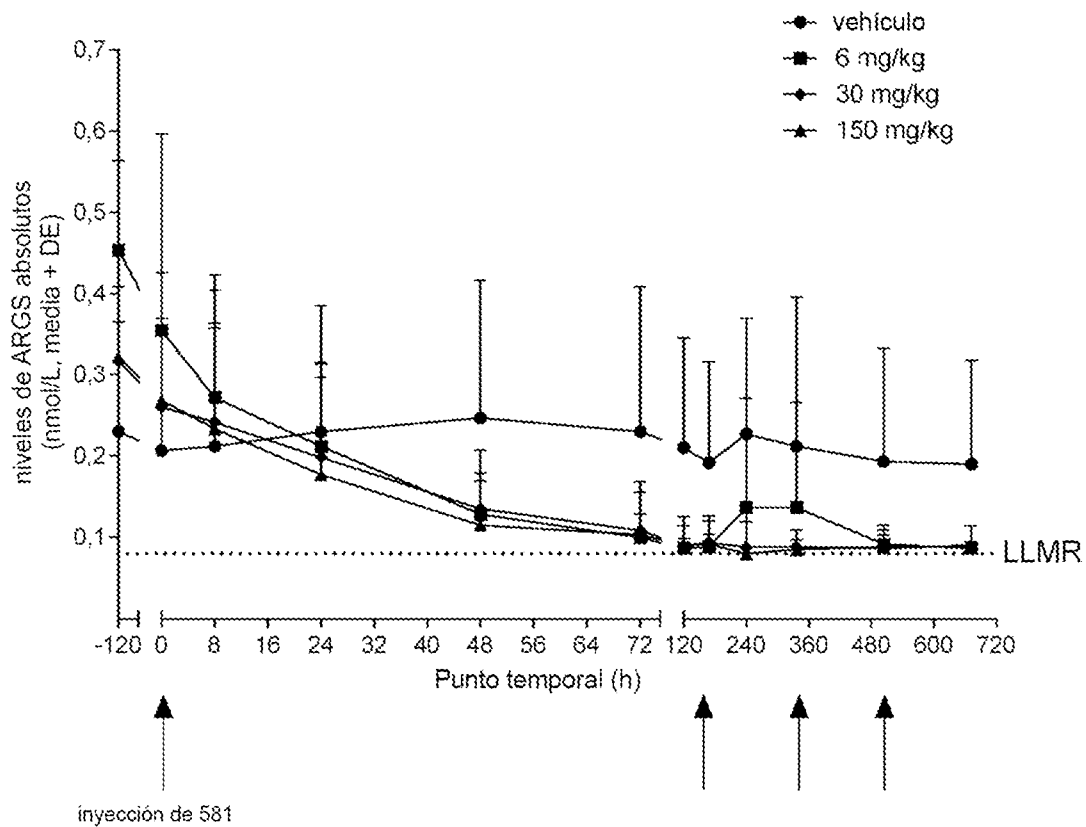


Figura 11

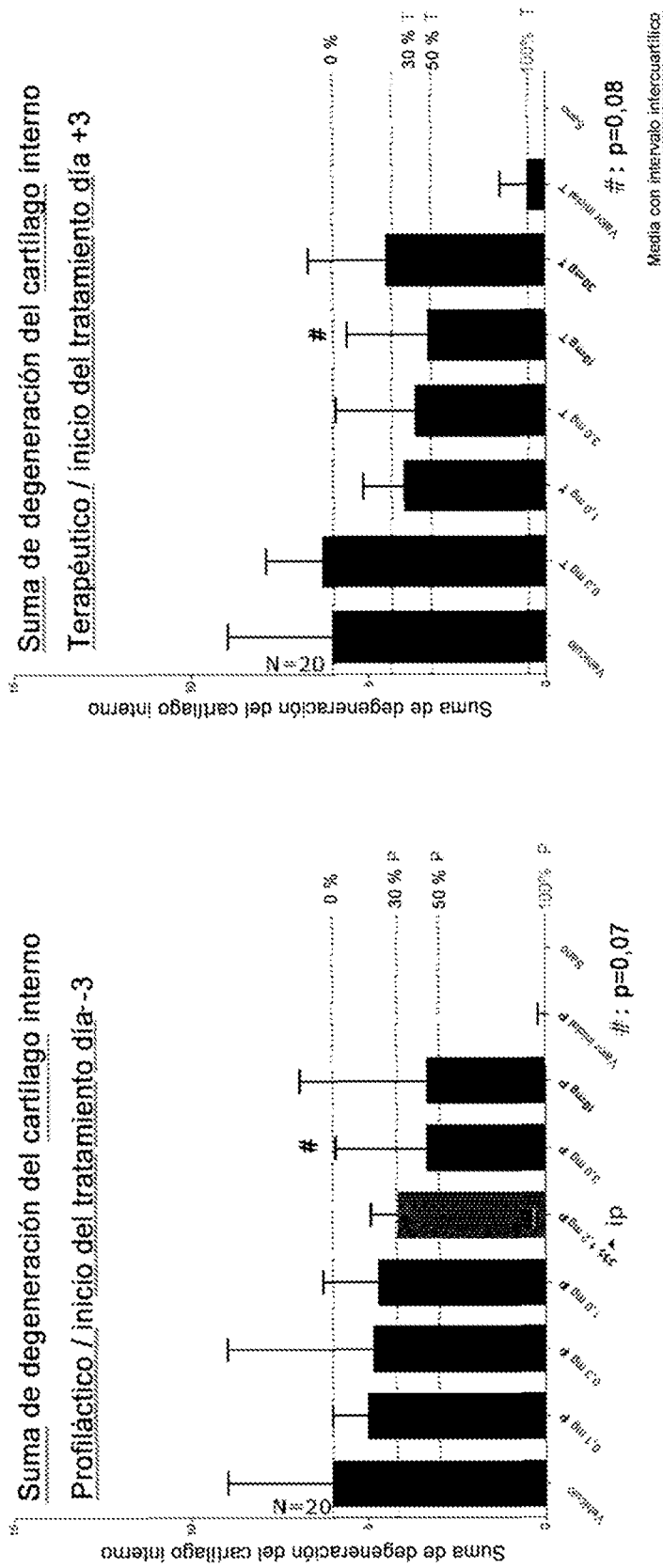


Figura 12

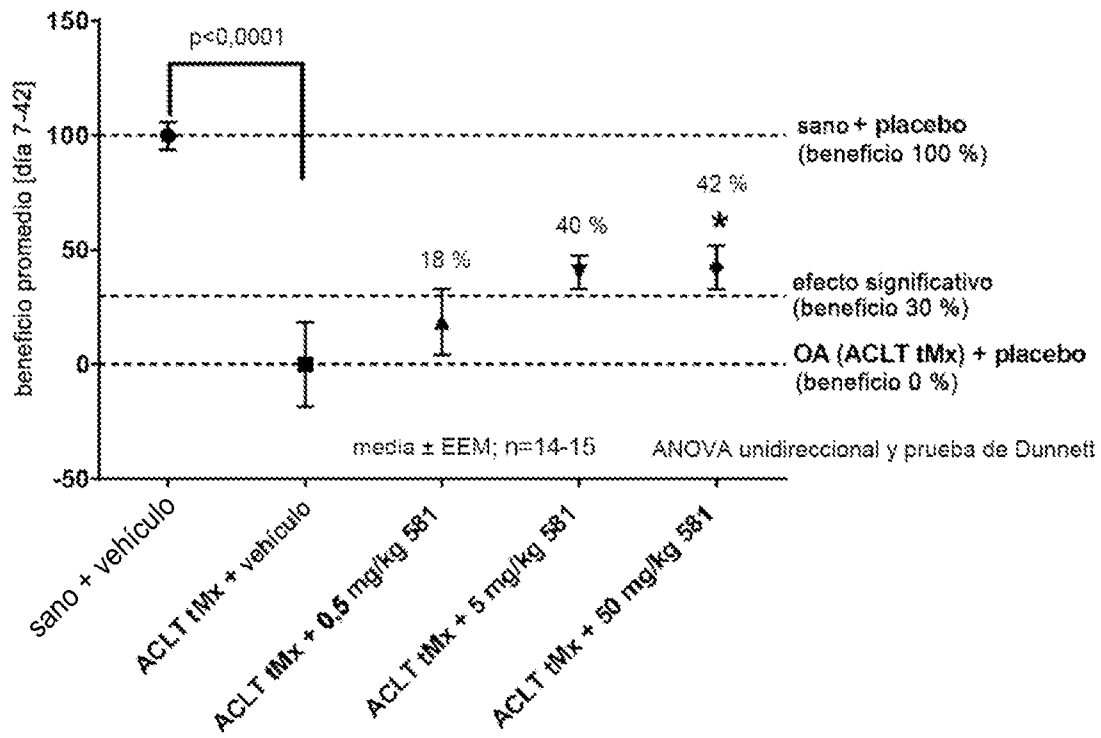


Figura 13

