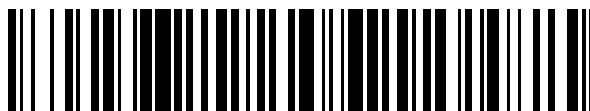


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 876**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2015** **PCT/US2015/057223**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016** **WO16065323**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2015** **E 15853465 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 3209685**

54 Título: **Anticuerpos de dominio sencillo contra antígenos intracelulares**

30 Prioridad:

23.10.2014 US 201462067908 P

16.04.2015 US 201562148656 P

02.07.2015 US 201562188353 P

27.08.2015 US 201562210795 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2019

73 Titular/es:

SINGH MOLECULAR MEDICINE, LLC (100.0%)

14153 Yosemite Drive, Suite 101

Hudson, FL 34667, US

72 Inventor/es:

SINGH, SUNANDA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 731 876 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

Anticuerpos de dominio sencillo contra antígenos intracelulares

5 Antecedentes

El uso de anticuerpos de dominio único (sdAb) como proteínas de unión a antígeno individuales o como dominio de unión a antígeno en proteínas o polipéptidos más grandes ofrece una serie de ventajas significativas sobre el uso de anticuerpos convencionales o fragmentos de anticuerpos. Las ventajas de los sdAb incluyen: solo se requiere un único dominio para unir un antígeno con alta afinidad y con alta selectividad; los sdAb pueden expresarse a partir de un solo gen y no requieren modificación posterior a la traducción; los sdAb son altamente estables al calor, pH, proteasas y otros agentes o condiciones desnaturalizantes; los sdAb no son caros de preparar; y los sdAb pueden acceder a dianas y epítomos no accesibles a los anticuerpos convencionales.

Hay una serie de enfermedades o afecciones, tales como el cáncer, que son provocada por componentes intracelulares o transmembrana aberrantes tales como nucleótidos y proteínas. La eliminación de los componentes aberrantes se puede usar para prevenir o tratar las enfermedades o afecciones. Hay varios compuestos farmacológicos disponibles para el tratamiento, pero los compuestos pueden ser ineficaces, imposibles de entregar o tóxicos a células no afectadas.

Otros tratamientos incluyen el uso de proteínas terapéuticas o agentes que contienen una secuencia de direccionamiento exógena para que el agente terapéutico pueda ser reconocido por los receptores en la membrana celular, permitiendo que el agente terapéutico cruce la membrana celular y entre en la célula. Una vez que el agente terapéutico está dentro de la célula, el agente terapéutico puede interactuar con el componente objetivo para tratar la enfermedad. Sin embargo, el uso de una secuencia de orientación exógena puede limitar el tipo de célula al que se dirige el agente terapéutico, y aumenta el coste de fabricación del agente terapéutico.

Por las razones anteriores, existe la necesidad de composiciones y métodos para tratar o prevenir una enfermedad que no se base en secuencias de direccionamiento exógenas o composiciones químicas para ingresar a la célula, y que sean efectivas para atacar solo a las células afectadas en el cuerpo.

La presente invención se refiere a anticuerpos de dominio único (sdAb), proteínas y polipéptidos que comprenden los sdAb. Los sdAb están dirigidos contra componentes intracelulares que provocan una afección o enfermedad. La invención también incluye ácidos nucleicos que codifican los sdAb, proteínas y polipéptidos, y composiciones que comprenden los sdAb. La invención incluye el uso de las composiciones, sdAb, proteínas o polipéptidos para fines profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico. La invención también incluye el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los sdAb de la invención. El documento WO2010/033913 divulga anticuerpos de dominio único para la selección de biomarcadores asociados a enfermedades en los que el biomarcador es STAT3. Kodappully et al. (Biochimica et Biophysica Acta 1845 (2014) 136-154) divulga STAT3 como un objetivo citoplásmico de inhibidores naturales y sintéticos en el tratamiento del cáncer.

Resumen

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas se consideran como no parte de la presente invención. La divulgación proporciona un anticuerpo de dominio único (sdAb) dirigido contra un componente intracelular. El componente intracelular puede ser, por ejemplo, una proteína, ácido nucleico, lípido, carbohidrato, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, TNF-alfa y KRAS. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3.

En otra realización, la invención está dirigida hacia un sdAb anti-STAT3, en el que el sdAb anti-STAT3 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.

La invención se dirige hacia un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que codifica un sdAb anti-STAT, tal como, por ejemplo, el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 3.

En otra realización más, la divulgación está dirigida hacia una célula huésped, y la célula huésped expresa la secuencia de aminoácidos del sdAb tal como, por ejemplo, el aminoácido expuesto en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

Una realización de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende un sdAb, o un polipéptido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el sdAb comprende un sdAb anti-STAT3 que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, y el polipéptido comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Otra realización de la invención es un método para diagnosticar un trastorno mediado por STAT3 en un sujeto, el método comprende las etapas de a) poner en contacto una muestra biológica con el sdAb, o un polipéptido; b) determinar la cantidad de STAT3 en la muestra biológica; y c) comparar la cantidad determinada en la etapa (b) con un estándar, una diferencia en la cantidad que indica la presencia del trastorno.

Otra realización de la divulgación es un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno, o prevenir la recurrencia de una enfermedad mediada por STAT3, o para su uso en el tratamiento del cáncer, o enfermedades provocada por una proliferación celular anormal, que comprende administrar un sdAb anti-STAT3, o un polipéptido, a un sujeto que lo necesite. Opcionalmente, el sdAb comprende un sdAb anti-STAT3 que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 y el polipéptido comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Una realización de la invención es un sdAb anti-TNF-alfa. Opcionalmente, el sdAb anti-TNF-alfa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7. La divulgación también comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

Otra realización de la divulgación es una célula huésped que expresa la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

En otra realización, la divulgación también es una composición farmacéutica que comprende un sdAb o un polipéptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el sdAb comprende un sdAb anti-TNF-alfa que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7 y el polipéptido comprende un polipéptido aislado que comprende un conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

Otra realización de la invención es un método para diagnosticar un trastorno mediado por TNF-alfa en un sujeto, el método comprende las etapas de a) poner en contacto una muestra biológica con un sdAb o un polipéptido; b) determinar la cantidad de TNF-alfa en la muestra biológica; y c) comparar la cantidad determinada en la etapa (b) con un estándar, una diferencia en la cantidad que indica la presencia del trastorno.

En una realización, la divulgación describe un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno o recurrencia de una enfermedad o trastorno mediado por TNF-alfa, o para su uso en el tratamiento del cáncer, o enfermedades provocada por una proliferación celular anormal, que comprende administrar un sdAb anti-TNF-alfa, o un polipéptido, a un mamífero que lo necesite.

Opcionalmente, el sdAb anti-TNF-alfa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7 y el polipéptido comprende un polipéptido aislado, el polipéptido aislado que comprende un conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

Una realización de la divulgación es un sdAb anti-KRAS. Opcionalmente, el sdAb anti-KRAS comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la invención comprende un polipéptido aislado, en el que el polipéptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la invención comprende una célula huésped que expresa la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.

Otra realización de la divulgación es una composición farmacéutica, que comprende un sdAb o un polipéptido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el sdAb comprende un sdAb anti-KRAS que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y el polipéptido comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.

Una realización adicional de la divulgación es un método para diagnosticar un trastorno mediado por KRAS en un sujeto, el método comprende las etapas de a) poner en contacto una muestra biológica con un sdAb o un polipéptido; b) determinar la cantidad de KRAS en dicha muestra biológica; y c) comparar la cantidad determinada en la etapa (b) con un estándar, una diferencia en la cantidad que indica la presencia del trastorno. Opcionalmente, el sdAb comprende un sdAb anti-KRAS que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y el polipéptido comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.

La divulgación también comprende un método para tratar una enfermedad usando un sdAb anti-KRAS, el método comprende administrar una cantidad eficaz de un sdAb anti-KRAS a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la divulgación describe un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno, o la recurrencia de una enfermedad o trastorno, mediado por KRAS, o para uso en el tratamiento del cáncer, o enfermedades provocada por una proliferación celular anormal, que comprende administrar un sdAb anti-KRAS o un polipéptido, a un mamífero que lo necesite. Opcionalmente, el sdAb anti-KRAS comprende una secuencia de

aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y el polipéptido comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. En una realización, la invención proporciona el sdAb a partir de la invención, para uso como un medicamento. En una realización, el sujeto es un mamífero; preferiblemente un humano.

En una realización, la invención describe un método para administrar el sdAb de la invención, el método comprende administración intravenosa, administración intramuscular, administración oral, administración rectal, administración intraocular, administración enteral, administración parenteral, administración subcutánea, administración transdérmica, administrado como gotas para los ojos, administrado como aerosol nasal, administrado por inhalación o nebulización, administración tópica y administrado como un fármaco implantable.

En otra realización, la invención describe un método para tratar una enfermedad, prevenir una enfermedad o prevenir la reaparición de una enfermedad usando el sdAb de la invención en combinación con uno o más compuestos. Opcionalmente, el uno o más compuestos es un inhibidor de la transcripción.

En otra realización, la invención describe un método para medir los niveles de un sdAb de la invención, el método comprende las etapas de a) generar un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra uno o más dominios del sdAb; b) realizar un inmunoensayo cuantitativo en una muestra del sujeto, en el que el inmunoensayo cuantitativo puede comprender opcionalmente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un marcado específico de analitos y un análisis de captura (SALRA), cromatografía líquida, espectrometría de masas, clasificación celular activada por fluorescencia, o una combinación de los mismos, con el anticuerpo monoclonal de ratón y la muestra para determinar la cantidad de sdAb en un sujeto; y c) cuantificar la cantidad de sdAb en el sujeto.

Dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los dibujos que se acompañan, en los que:

La fig. 1 es un mapa esquemático del vector de expresión de sdAb anti-STAT3 VHH13 pTT21-stt VHH13;

La fig. 2 es un mapa esquemático del vector de expresión sdAb anti-STAT3 de VHH14 pTT21-stt VHH14;

La fig. 3 representa los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación usando VHH13 STAT3 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) y VHH14 STAT3 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 4);

La fig. 4 representa los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación utilizando VHH13 STAT3 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3);

La fig. 5 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb VHH13 (SEQ ID NO: 3) bacteriano anti-STAT3 en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231, dosificado a 0.5 mg/kg/día;

La fig. 6 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ. ID. NO. 3) en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 a dosis de 1 mg/kg dos veces al día a 2 mg/kg dos veces al día o 2 mg/kg/día;

La fig. 7 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231, dosificado a 5 mg/kg/dos veces al día;

La fig. 8 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto DU145, dosificado a 5 mg/kg/dos veces al día;

La fig. 9 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto de PANC-1, dosificado a 5 mg/kg/dos veces al día;

La fig. 10 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto MCF-7, dosificado a 1 mg/kg/tres veces al día;

La fig. 11 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto BT-474, dosificado a 1 mg/kg/tres veces al día;

La fig. 12 ilustra la citotoxicidad de TNF-alfa en células U937;

La fig. 13 ilustra la citotoxicidad de la estaurosporina en células U937; y

La fig. 14 ilustra la inhibición de la citotoxicidad del TNF-alfa por los sdAb anti-TNF-alfa.

Descripción

Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos y variaciones de los mismos tienen los significados que se dan a continuación, a menos que el contexto en el que se usa dicho término signifique claramente un significado diferente.

5 Se debe interpretar que los términos “un”, “uno” y “los” y similares que se usan en este documento cubren tanto el singular como el plural, a menos que su uso en el contexto indique lo contrario.

10 El término “determinante antigénico” se refiere al epítipo en el antígeno reconocido por la molécula de unión a antígeno (como un sdAb o polipéptido de la invención) y más en particular por el sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno. Los términos “determinante antigénico” y “epítipo” también se pueden usar indistintamente. Una secuencia de aminoácidos que se puede unir a, que tiene afinidad y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico específico, epítipo, antígeno o proteína se dice que está “contra” o “dirigida contra” el determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

15 Como se usa en este documento, el término “comprende” y las variaciones del término, tales como “que comprende” y “comprende”, no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

20 Se contempla que los sdAb, polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento pueden contener las llamadas sustituciones de aminoácidos “conservadoras”, que en general se pueden describir como sustituciones de aminoácidos en las que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido de similar estructura química y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son bien conocidas en la técnica. Las sustituciones conservativas son sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a)-(e) está sustituido por otro aminoácido dentro del mismo grupo: (a) pequeños residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares, cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) Grandes residuos alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Otras sustituciones conservativas incluyen: Ala en Gly o en Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en Su; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; Su 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; Encontrado 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...

35 Un “dominio” como se usa en este documento generalmente se refiere a una región globular de una cadena de anticuerpo, y en particular a una región globular de un anticuerpo de cadena pesada, o a un polipéptido que consiste esencialmente en tal región globular.

40 La secuencia de aminoácidos y la estructura de un sdAb se compone típicamente de cuatro regiones marco o “FR”, que se denominan “región marco 1” o “FR1”; como “Marco de la región 2” o “FR2”; como “Marco de la región 3” o “FR3”; y como “Marco de la región 4” o “FR4”, respectivamente. Las regiones marco están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o “CDR”, que se denominan “región determinante de complementariedad 1” o “CDR1”; como “Complementarity Determining Region 2” o “CDR2”; y como “Región 3 de Determinación de Complementariedad” o “CDR3”, respectivamente.

45 Como se usa en este documento, el término “sdAb humanizado” significa un sdAb que ha tenido uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de VHH natural reemplazada por uno o más de los residuos de aminoácidos que aparecen en la posición correspondiente en un dominio VH de un anticuerpo de cadena 4 convencional de un humano. Esto se puede realizar mediante métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las FR de los sdAb se pueden reemplazar por las FR de variables humanas.

50 Como se usa en este documento, un ácido nucleico o aminoácido “aislado” se ha separado de al menos otro componente con el que generalmente está asociado, como su fuente o medio, otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o contaminante, impureza o componente menor.

55 El término “mamífero” se define como un individuo que pertenece a la clase Mammalia e incluye, sin limitación, humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportes y mascotas, tales como vacas, caballos, ovejas, perros y animales. los gatos

60 Como se usa en este documento, “portador farmacéuticamente aceptable” está destinado a incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en este campo. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, PBS (solución salina tamponada con fosfato) y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden usar liposomas, lípidos catiónicos y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto

en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con un agente terapéutico como se definió anteriormente, se contempla su uso en la composición de la presente invención.

Un “inmunoensayo cuantitativo” se refiere a cualquier medio para medir una cantidad de antígeno presente en una muestra utilizando un anticuerpo. Los métodos para realizar inmunoensayos cuantitativos incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), marcaje de analitos específicos y ensayo de recaptura (SALRA), cromatografía líquida, espectrometría de masas, clasificación de células activadas por fluorescencia y similares.

El término “solución” se refiere a una composición que comprende un disolvente y un soluto, e incluye soluciones y suspensiones verdaderas. Los ejemplos de soluciones incluyen un sólido, líquido o gas disuelto en un líquido y partículas o micelas suspendidas en un líquido.

El término “especificidad” se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos a los que se puede unir una molécula de unión a antígeno particular o una molécula de proteína de unión a antígeno. La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse en función de la afinidad y/o la avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (KD), es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor sea el valor de la KD, más fuerte es la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión al antígeno (alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (KA), que es $1/KD$). Como será claro para un experto en la técnica, la afinidad se puede determinar dependiendo del antígeno específico de interés. La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno y el antígeno. La avidéz está relacionada con la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno y el número de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión a antígeno. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse por cualquier medio conocido, como, por ejemplo, el análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición en sándwich.

Como se usa en el presente documento, el término “recombinante” se refiere al uso de métodos de ingeniería genética (por ejemplo, clonación y amplificación) utilizados para producir los sdAb de la invención.

Un “anticuerpo de dominio único”, “sdAb” o “VHH” puede definirse generalmente como un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende cuatro regiones marco interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad. Esto se representa como FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Un sdAb de la invención también incluye un polipéptido o proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de sdAb. Típicamente, los sdAb se producen en camélidos como las llamas, pero también pueden generarse sintéticamente utilizando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Como se usa en el presente documento, los dominios variables presentes en los anticuerpos de cadena pesada que se producen naturalmente también se denominarán “dominios VHH”, para distinguirlos de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en los anticuerpos de cadena 4 convencionales, denominados “Dominios VH”, y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de cadena 4 convencionales, denominados “dominios VL”, “VHH” y “sdAb” se usan indistintamente en este documento. La numeración de los residuos de aminoácidos de un sdAb o polipéptido está de acuerdo con la numeración general para los dominios VH dada por Kabat et al. (“Sequence of proteins of immunological interest,” US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91). Según esta numeración, FR1 de un sdAb comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30, CDR1 de un sdAb comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 31-36, FR2 de un sdAb comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un sdAb comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-65, FR3 de un sdAb comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 66-94, CDR3 de un sdAb comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y FR4 de un sdAb comprende Residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

El término “sintético” se refiere a la producción por síntesis química o enzimática in vitro.

El término “objetivo”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier componente, antígeno o fracción que sea reconocido por el sdAb. El término “objetivo intracelular” se refiere a cualquier componente, antígeno o fracción presente dentro de una célula. Una “diana transmembrana” es un componente, antígeno o fracción que se encuentra dentro de la membrana celular. Un “objetivo extracelular” se refiere a un componente, antígeno o fracción que se encuentra fuera de la célula.

Una “composición terapéutica” como se usa en el presente documento significa una sustancia que se pretende que tenga un efecto terapéutico tal como composiciones farmacéuticas, materiales genéticos, productos biológicos y otras sustancias. Los materiales genéticos incluyen sustancias destinadas a tener un efecto terapéutico genético directo o indirecto, como vectores genéticos, elementos reguladores genéticos, elementos estructurales genéticos, ADN, ARN y similares. Los productos biológicos incluyen sustancias que son materia viva o derivadas de materia viva con la intención de tener un efecto terapéutico.

Como se usa en el presente documento, las frases “cantidad terapéuticamente eficaz” y “cantidad profilácticamente eficaz” se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o manejo de una enfermedad o un síntoma manifiesto de la enfermedad. La cantidad terapéuticamente efectiva puede tratar una enfermedad o afección, un síntoma de la enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición a la enfermedad. La cantidad específica que es terapéuticamente efectiva puede determinarse fácilmente por un médico ordinario, y puede variar dependiendo de los factores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el tipo de enfermedad, el historial y la edad del paciente, la etapa de la enfermedad y La administración de otros agentes terapéuticos.

La presente invención se refiere a anticuerpos de dominio único (sdAb) que se dirigen contra componentes intracelulares, así como a proteínas y polipéptidos que comprenden los sdAb y nucleótidos que codifican las proteínas y polipéptidos. La invención también puede relacionarse con los sdAb que se dirigen contra dianas o antígenos intercelulares, transcelulares y extracelulares. La invención también incluye ácidos nucleicos que codifican los sdAb, proteínas y polipéptidos, y composiciones que comprenden los sdAb. La invención incluye el uso de las composiciones, sdAb, proteínas o polipéptidos para fines profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico.

Los SdAb tienen una serie de características estructurales y propiedades funcionales únicas que hacen que los sdAb sean altamente ventajosos para su uso como dominios o proteínas funcionales de unión a antígeno. Los SdAb se unen funcionalmente a un antígeno en ausencia de un dominio variable de cadena ligera, y pueden funcionar como una única unidad estructural, dominio o proteína de unión a antígeno funcional. Esto distingue a los sdAb de los dominios de los anticuerpos convencionales, que por sí mismos no funcionan como una proteína o dominio de unión a antígeno, pero deben combinarse con fragmentos de anticuerpos convencionales como los fragmentos Fab o el fragmento de ScFv para unirse a un antígeno.

Los SdAb se pueden obtener usando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método para obtener sdAb incluye (a) inmunizar un Camélido con uno o más antígenos, (b) aislar linfocitos periféricos del Camélido inmunizado, obtener el ARN total y sintetizar los ADNc correspondientes, (c) construir una biblioteca de fragmentos ADNc que codifican los dominios VHH, (d) transcribir los cADN codificadores del dominio VHH obtenidos en la etapa (c) al ARNm usando PCR, convirtiendo el ARNm al formato de presentación del ribosoma, y seleccionando el dominio VHH mediante visualización del ribosoma, y (e) expresar el dominio VHH en un vector adecuado y, opcionalmente, purificar el dominio VHH expresado.

Otro método para obtener los sdAb de la invención es preparar un ácido nucleico que codifica un sdAb usando técnicas para la síntesis de ácido nucleico, seguido de la expresión del ácido nucleico in vivo o in vitro. Además, el sdAb, los polipéptidos y las proteínas de la invención se pueden preparar utilizando técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos.

Los sdAb de la invención generalmente se unirán a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de la diana que se producen de forma natural, o al menos a esos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de la diana que contiene uno o más determinantes antigénicos o epítomos que son esencialmente los mismos que el determinante antigénico o epítomo al que se unen los sdAb de la invención en el objetivo de tipo silvestre. Los sdAb de la invención se pueden unir a tales análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que es igual o mayor o menor que la afinidad y especificidad con la que los sdAb de la invención se une al objetivo de tipo silvestre. También se contempla dentro del alcance de la invención que los sdAb de la invención se unen a algunos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de la diana, pero no a otros. Además, el sdAb de la invención puede ser humanizado, y puede ser monovalente o multivalente, y/o multiespecífico. Además, los sdAb de la invención pueden unirse a la forma fosforilada de la proteína diana, así como a la forma no fosforilada de la proteína diana. Los sdAb se pueden unir a otras moléculas como la albúmina u otras macromoléculas. Los sdAb de la invención pueden unirse a la forma fosforilada de la proteína diana, así como a la forma no fosforilada de la proteína diana. Los sdAb se pueden unir a otras moléculas como la albúmina u otras macromoléculas. Los sdAb de la invención pueden unirse a la forma fosforilada de la proteína diana, así como a la forma no fosforilada de la proteína diana. Los sdAb se pueden ligar a otras moléculas como la albúmina u otras macromoléculas.

Además, está dentro del alcance de la invención que los sdAb son multivalentes, es decir, el sdAb puede tener dos o más proteínas o polipéptidos que están dirigidos contra dos o más epítomos diferentes de la diana. En tal sdAb multivalente, la proteína o el polipéptido puede dirigirse, por ejemplo, contra los mismos epítomos, epítomos sustancialmente equivalentes, o diferentes epítomos. Los diferentes epítomos pueden estar ubicados en el mismo objetivo, o podrían estar en dos o más objetivos diferentes.

También se contempla que la secuencia de uno o más sdAb de la invención se puede conectar o unir con una o más secuencias enlazadoras. El enlazador puede ser, por ejemplo, una secuencia de proteínas que contiene una combinación de serinas, glicinas y alaninas.

También está dentro del alcance de la invención usar partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de los sdAb de la invención, siempre que estos sean adecuados para los usos descritos.

Dado que los sdAb de la invención están destinados principalmente para uso terapéutico y/o diagnóstico, están dirigidos contra dianas de mamífero, preferiblemente humanas. Sin embargo, es posible que los sdAb descritos en el presente documento tengan reactividad cruzada con objetivos de otras especies, por ejemplo, con objetivos de una o más especies de primates u otros animales (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo o perro), y en particular en modelos animales para enfermedades y trastornos asociados con la enfermedad asociada con los objetivos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un sdAb de la invención. Dicho ácido nucleico puede estar, por ejemplo, en forma de un constructo genético.

En otro aspecto, la invención se refiere a un huésped o a una célula huésped que expresa o es capaz de expresar un sdAb de la invención, y/o que contiene un ácido nucleico que codifica un sdAb de la invención. Se pueden usar secuencias de los sdAb para insertar en el genoma de cualquier organismo para crear un organismo modificado genéticamente (OGM). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, plantas, bacterias, virus y animales.

La invención se refiere además a métodos para preparar o generar los sdAb, ácidos nucleicos que codifican los sdAb, células huésped que expresan o son capaces de expresar dichos sdAb, productos y composiciones que contienen los sdAb de la invención.

La invención se refiere además a aplicaciones y usos del sdAb, los ácidos nucleicos que codifican los sdAb, células huésped, productos y composiciones descritos en el presente documento. Dicho producto o composición puede ser, por ejemplo, una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, o un producto o composición para uso diagnóstico. Los sdAb se pueden usar en una variedad de ensayos, por ejemplo, ensayos ELISA y ensayos de espectrometría de masas para medir los niveles de suero y tejido de los sdAb.

En otro aspecto, un ácido nucleico que codifica uno o más sdAb de la invención puede insertarse en el genoma de un organismo para tratar o prevenir enfermedades.

La presente invención se refiere en general a los sdAb, así como a proteínas o polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más de tales sdAb, que pueden usarse con fines profilácticos, terapéuticos y/o de diagnóstico.

Los métodos y composiciones detallados en la presente invención pueden usarse para tratar la enfermedad descrita en el presente documento, y pueden usarse con cualquier dosificación y/o formulación descrita en el presente documento o conocida de otra manera, así como con cualquier vía de administración descrita en este documento o de otro modo. Conocido por un experto en la técnica.

Los sdAb de la invención, en particular el VHH anti-STAT3, el VHH anti-KRAS y el VHH anti-TNF-alfa de la presente invención, se pueden usar para el tratamiento y la prevención de enfermedades malignas que incluyen, entre otros: mieloma múltiple, leucemias (dependiente de HTLV-1, eritroleucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfocítica granular (LGG), linfomas (EBV relacionado/Burkitt, micosis fungoides, célula T cutánea linfoma no Hodgkins linfoma (LNH), linfoma de células grandes anaplásico (ALCL), cánceres de mama, cánceres de mama triple negativos, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, sarcomas, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Ewing, cáncer hepatocelular, glioma, neuroblastoma, astrocitoma, cánceres colorrectales, tumores de Wilm, cánceres renales, cánceres de vejiga, cánceres endometriales, cánceres cervicales, cánceres de esófago, cánceres de células escamosas cutáneas, cánceres de células basales y cualquier tipo de cáncer metastático. Los sdAb pueden usarse en pacientes con cáncer para ayudar a prevenir o reducir la pérdida de peso o caquexia por cáncer.

El sdAb, en particular el anti STAT3 y los sdAb anti-TNF-alfa de la presente invención, también se pueden usar para el tratamiento y la prevención de enfermedades como, entre otras, las enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, Enfermedad de Crohn, colitis inducida por bacterias, asma, esclerodermia, lupus, encefalomiелitis, arteritis, vasculitis, glomerulonefritis, uveoretinitis, esclerosis múltiple), enfermedad del riñón poliquístico, enfermedades dermatológicas (por ejemplo, Psoriasis, alopecia areata, atopicóptica), lipoma, enfermedad de Padgett y queratosis actínica, hidradenitis supurativa, trasplante (por ejemplo, órgano sólido, médula ósea, mano, cara, extremidades, cualquier parte del cuerpo), distrofia muscular y desgaste muscular asociado con cáncer y envejecimiento, endometriosis, degeneración macular, degeneración de la retina, derrame cerebral, epilepsia, traumatismo cerebral y lesiones de la médula espinal, hipertensión, hipertrofia cardíaca, enfermedad de Alzheimer, hipertensión de la arteria pulmonar, diabetes mellitus tipo 2 y espondilitis anquilosante. Además, los sdAb pueden atacar enfermedades huérfanas. Los ejemplos de estas enfermedades huérfanas raras incluyen, pero no se limitan a, cánceres de mama triple negativos, cánceres pancreáticos, AML (leucemia mieloide aguda), cánceres de cabeza y cuello, mieloma múltiple y cánceres de quimiorresistencia.

Las infecciones víricas pueden tratarse dirigiéndose a proteínas víricas intracelulares en células infectadas. Las proteínas virales, como la transcriptasa inversa del VIH, pueden bloquear el ciclo de vida viral. El sdAb de la invención también puede dirigirse a proteínas virales intracelulares tales como Ebola VP24 y, por lo tanto, bloquear la capacidad del ébola para desactivar la respuesta inmunitaria antiviral del huésped. Los sdAb de la invención se pueden usar para atacar enfermedades cuando hay una sobreexpresión de una molécula intracelular. La enfermedad de Huntington se puede tratar con sdAb.

Los sdAb de la invención se pueden usar con uno o más compuestos. Por ejemplo, el sdAb de la invención se puede usar con inhibidores de JAK/STAT tales como, por ejemplo, curcumina, resveratrol, cucurbitacina A, B, E, I, Q, flavopiridol, desoxitetrangomicina, derivados de ciclopentenona, N-Acilmoserina lactona, derivados de indirubina, meisoindigo, tirfostinas, compuestos que contienen platino (por ejemplo, IS3-295), peptidomiméticos, oligonucleótidos antisentido, S3I-201, derivados del tripéptido fosfotirosina, inhibidores de la proteasa del VIH (por ejemplo, nelfinavir, indinavir, saquinavir, y ritonavir), JSI-124, XpYL, Ac-pYLPQTV-NH₂, ISS 610, CJ-1383, pirimetamina, Metformina, Atiprimod, S3I-M2001, STX-0119; derivados de N-[2-(1,3,4-oxadiazolil)]-4 de quinolincarboxamida, S3I-1757, LY5; 5,8-dioxo-6(piridin-3-ilamino)-5,8, -dihidro-naftaleno-1-sulfonamida, con acetina, Stattic, STA-21, LLL-3, LLL12, XZH-5, SF-1066, SF-1087, 17o, Cryptotanshinone, FLL32, FLL62, C188-9, BP-1108 y BP-1075, Galiellactona, JQ1, 5, 15 DPP, WP1066, Niclosamida, SD1008, Nifuroxazida, criptotanshinona, quinona BBI y fosfato de luxolitinib. El uno o más compuestos pueden aumentar la respuesta terapéutica y aumentar la eficacia del sdAb de la invención. Además, la eficacia del sdAb puede aumentarse combinándolo con péptidos, peptidomiméticos y otros fármacos, como, por ejemplo, pero sin limitarse a, cimetidina, atorvastatina, celecoxib, metformina y cimetidina. Además, los sdAb anti-STAT3 pueden convertir los cánceres radorresistentes en cánceres radiosensibles con respecto a la radioterapia.

También se contempla que uno o más sdAb de la invención se pueden combinar, o los sdAb de la invención se pueden combinar con otros sdAb.

Se contempla que ciertos sdAb de la invención pueden cruzar la membrana celular y entrar en la célula sin la ayuda de secuencias de proteínas de direccionamiento adicionales en el sdAb, y sin la ayuda de compuestos exógenos que dirigen al sdAb a unirse a los receptores de superficie celular y cruzan la membrana celular.

Después de cruzar la membrana celular, estos sdAb pueden dirigirse a moléculas o antígenos transmembrana o intracelulares. Estas dianas intracelulares o transmembrana pueden ser, por ejemplo, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas mutadas, proteínas virales y priones. Las dianas sdAb pueden funcionar como enzimas, proteínas estructurales de la célula, porciones intracelulares de moléculas de membrana celular, moléculas dentro de las membranas de organelos, cualquier tipo de molécula de ARN, cualquier región de ADN o cromosoma, ácidos nucleicos metilados o no metilados, moléculas parcialmente ensambladas. dentro del mecanismo de síntesis de la célula, las moléculas del segundo mensajero y las moléculas dentro de los mecanismos de señalización celular. Los objetivos pueden incluir todas las moléculas en el citoplasma, núcleo, orgánulos y membrana celular. Las moléculas destinadas a la secreción o la colocación en la membrana celular pueden dirigirse dentro del citoplasma antes de abandonar la célula.

Las dianas sdAb pueden ser en humanos, animales, plantas, hongos, parásitos, protistas, bacterias, virus, priones, células procarióticas y células eucariotas. Algunos ejemplos de moléculas de señalización inter e intracelular y grupos de proteínas a los que pueden dirigirse los sdAb de la invención son: productos oncogénicos, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, neurotransmisores, quinasas (incluida la tirosina quinasa, la serina quinasa y la treonina quinasa), fosfatasa, ubiquitina, nucleótidos cíclicos, ciclasas (adenililo y guanililo), proteínas G, fosfodiesterasas, superfamilia de GTPasa, inmunoglobulinas (anticuerpos, fragmentos Fab, aglomerantes, sdAb), superfamilia de inmunoglobulinas, lípidos de fosfato de inositol, esteroides, receptores, CD4, CD8, CD28, etc.), factores de transcripción, TGF-beta, TNF-alfa y beta, superfamilia de ligandos de TNF, moléculas de señalización del receptor de muesca, moléculas de señalización del receptor hedgehog, moléculas de señalización del receptor Wnt, moléculas de señalización del receptor de tipo toll, caspasas, actina, miosina, miostatina, 12 lipoxigenasa, 15-lipoxigenasa, superfamilia de lipoxigenasa, transcriptasa inversa, virus y sus proteínas, proteínas amiloides, colágeno, receptores acoplados a proteína G, proteínas normales mutadas, priones, Ras, Raf, Myc, Src, BCR/ABL, MEK, Erk, Mos, Tpl2, MLK3, TAK, DLK, MKK, p38, MAPK, MEKK, ASK, SAPK, JNK, BMK, MAP, JAK, PI3K, ciclooxigenasa, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, Myc, p53, BRAF, NRAS, KRAS, HRAS y quimioquinas.

KRAS es un homólogo de oncogén ras de Kirsten de la familia de genes ras de mamíferos. KRAS codifica una proteína que es miembro de la pequeña superfamilia GTPasa. La proteína está implicada en varias neoplasias malignas, como el adenocarcinoma de pulmón, el adenoma mucinoso, el carcinoma ductal del páncreas y el carcinoma colorrectal. En condiciones normales, los miembros de la familia Ras influyen en el crecimiento celular y en los eventos de diferenciación en un sistema de señalización basado en compartimentación de membrana subcelular. Sin embargo, Ras oncogénico puede desregular procesos que controlan tanto la proliferación celular como la apoptosis.

Los sdAb anti-KRAS se desarrollaron para dirigir KRAS de tipo silvestre y mutado (G12D) con el fin de interrumpir su función en células malignas como, por ejemplo, células involucradas en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, cáncer de pulmón, leucemias y otras neoplasias metastásicas. Sin estar limitado por un mecanismo particular, se cree que el sdAb anti-KRAS se une a KRAS y bloquea la señalización en la dirección descendente de la

secuencia de KRAS en las células malignas. Además, el sdAb anti-KRAS puede tratar con éxito los tumores malignos que son resistentes a los productos biológicos anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab y panitumumab).

Usando métodos que son bien conocidos en la técnica, se usó la proteína KRAS (G12D) mutante humana recombinante para generar sdAb que se dirigen contra un epítipo de KRAS o KRAS mutante (G12D), u otros mutantes KRAS. Además, los sdAb se pueden generar a otros mutantes KRAS. Para generar los sdAb anti-KRAS, se expresó KRAS humano recombinante de longitud completa (ID de gen: 3845) en *Escherichia coli*.

Se obtuvieron y seleccionaron varios sdAb. La secuencia de ADN de un anticuerpo anti-KRAS sdAb (G12D), nombrado KRAS_13 (SEQ ID NO: 1), se muestra a continuación:

```
5'Gaggtgcagctggtgagctctggggaggctcggcgagactggagggtctctgagactctctgtgcagttctggaaatcggc
agcagctactgcacatgggctggtccgccaggctccagggaagaagcgcgagcggtgcacgtattgtacgtgatgggccactggct
acgcagactacgtgaaggccgattcaccatctcccgagacgcgccaagaacactctgtatctgcaaatgaacaggctgatacctgag
gacactgccactactactgtgcggcagacctccccaggtgtttgactcaggcgattggaattttggtatcggggccagggaaccct
ggtcaccgtctctca-3'
```

La secuencia de aminoácidos de la anti-KRAS (G12D) sdAb (SEQ ID NO: 2.), KRAS_13, se muestra a continuación, con las CDR subrayadas:

```
EVQLVESGGGSVQTGGSLRLSCAVSGNIGSSYCMGWFRQAPGKKREAVARIVRDGAT
GYADYVKGRFTISRDSAKNTLYLQMNRLIPEDTAIYYCAADLPPGCLTQAIWNFGYRG
QGTLTVTVSS
```

Además, la presente invención comprende uno o más anticuerpos monoclonales de ratón que están dirigidos contra uno o más dominios del sdAb anti-KRAS de la invención. El anticuerpo monoclonal de ratón puede generarse por métodos que son conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal de ratón puede producirse por un hibridoma de ratón. El anticuerpo monoclonal de ratón se puede usar en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, el anticuerpo se puede usar en un inmunoensayo como un ELISA o un ensayo de espectrometría de masas para medir la cantidad de sdAb anti-KRAS presente en el suero de un paciente. La citotoxicidad de KRAS (G12D) sdAb en células de cáncer pancreático humano PANC-1 se probó, como se describe a continuación.

STAT3 es un miembro de la familia de proteínas de transductores de señal y activadores de transcripción (STAT) que llevan tanto la transducción de señal como la activación de las funciones de transcripción. STAT3 se expresa ampliamente y se activa a través de la fosforilación en tirosina y/o serina como una proteína de unión al ADN en respuesta a varias citoquinas y factores de crecimiento como EGF, IL-6, PDGF, IL-2 y G-CSF. La fosfoproteína STAT3 forma homodímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia STAT y se traslada al núcleo para modular la transcripción de varios genes, y como resultado desempeña un papel clave en muchos procesos celulares como el crecimiento celular, la apoptosis, la angiogénesis, evasión inmune, y supervivencia.

Se puede administrar un sdAb anti-STAT3 a pacientes y otros organismos para tratar enfermedades provocada por STAT3 fosforilado y no fosforilado, así como para prevenir el desarrollo de la enfermedad o la recurrencia de la enfermedad. Por ejemplo, los pacientes que se han sometido a un trasplante de órganos y un trasplante de médula ósea tienen un mayor riesgo de SCCA y BCCA cutáneos debido a los medicamentos inmunosupresores que toman. La administración de un sdAb anti-STAT3 puede reducir o eliminar este riesgo. Los pacientes tratados por una neoplasia maligna con riesgo de recurrencia se beneficiarán del tratamiento con el sdAb anti-STAT3. Según el historial médico familiar y el tipo de HLA, algunas personas tendrán un mayor riesgo de padecer algunos tipos de enfermedades autoinmunitarias y podrían beneficiarse del tratamiento con sdAb para reducir el riesgo de desarrollar esa enfermedad autoinmune. El riesgo de cáncer de mama puede reducirse con la administración de medicamentos anti-STAT3 como GLG 302, como se demostró en un estudio reciente del NCI.

Además de la inhibición de STAT3, el sdAb anti-STAT3 también puede inhibir STAT1, STAT2, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6 debido al alto grado de homología entre estas moléculas.

Se usó la proteína STAT3 humana recombinante para producir los sdAb anti-STAT que se dirigían contra o pueden unirse a un epítipo de STAT3. Para generar los sdAb anti-STAT3, se expresó STAT3 humano de longitud completa recombinante (ID de gen: 6774) mediante baculovirus en células de insecto Sf9. Los sdAb anti-STAT se clonaron en vectores que pueden expresarse tanto en células bacterianas como en células de mamíferos, como se muestra en las Figs. 1 y 2.

El sdAb anti-STAT3 de la invención se puede usar para dirigir a STAT3 y a todas las demás moléculas STAT dentro de la célula para inhibir el crecimiento celular, tal como, por ejemplo, la supresión del crecimiento de células cancerosas. Además, el sdAb anti-STAT3 puede inhibir el crecimiento celular en otras enfermedades proliferativas como la psoriasis y la degeneración macular a través de VEGF.

Sin limitarse a un mecanismo de acción particular, se piensa que el sdAb anti-STAT3 puede eliminar la supresión inmunitaria inducida por cáncer al disminuir los niveles de STAT3 en células presentadoras de antígeno tales como, por ejemplo, células dendríticas hospedadoras. La inhibición de STAT3 promueve la respuesta contra el cáncer en los sistemas inmunitarios innatos y adaptativos del paciente (es decir, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células T, células NK y células B).

Usando métodos que son bien conocidos en la técnica, se obtuvieron varios sdAb anti-STAT y se examinaron para determinar la capacidad para suprimir el crecimiento de células cancerosas e inducir apoptosis en estirpes celulares de cáncer, como se describe a continuación. Se evaluaron la citotoxicidad y las actividades antiproliferativas de los sdAb anti-STAT3. Además, la tolerancia de los sdAb anti-STAT3 se probó in vitro e in vivo. La producción de anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra uno o más dominios de los sdAb anti-STAT se describe a continuación.

La secuencia de amino ácido de un anti-STAT3 sdAb, llamada VHH13 (SEQ ID NO: 3), se muestra a continuación:

HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS

Las tres CDR están subrayadas.

La secuencia de amino ácido de un segundo anti-STAT3 sdAb, llamada VHH14 (SEQ ID NO: 4), se muestra a continuación:

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTVKPEDAAMYYCAARE
GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS

Una vez más, los tres CDR están subrayados. Las secuencias de proteínas de otros sdAb anti-STAT3 que se obtuvieron son los siguientes:

STAT3_10 (SEQ ID NO: 5):

(1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
 (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTVKPEDAAMYYCAARE
 (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS

STAT3_34 (SEQ ID NO: 6):

(1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
 (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTVKPEDAAMYYCAARE
 (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS

STAT3_19 (SEQ ID NO: 7):

(1) HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
 (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTVKPEDAAMYYCAARE
 (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS

STAT3_14 (SEQ ID NO: 8):

(1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
 (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTVKPEDAAMYYCAARE
 (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS

STAT3_35 (SEQ ID NO: 9):

(1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
 (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTVKPEDAAMYYCAARE
 (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS

STAT3_9 (SEQ ID NO: 10):

(1) QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
(48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTPKPEDAAMYCAARE
(98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGLTVTVSS

STAT3_30 (SEQ ID NO: 11):

(1) QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
(48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTPKPEDAAMYCAARE
(98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGLTVTVSS

STAT3_23 (SEQ ID NO: 12):

(1) QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
(48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTPKPEDAAMYCAARE
(98) GWECGETWLDRTAGSHTYWGQGLTVTVSS

STAT3_24 (SEQ ID NO: 13):

(1) EVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
(48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTPKPEDAAMYCAARE
(98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGLTVTVSS

STAT3_36 (SEQ ID NO: 14):

(1) DVQLVESGGGVSQAGDSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
(48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTPKPEDAAMYCAARE
(98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGLTVTVSS

STAT3_12 (SEQ ID NO: 15):

(1) QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSAAAGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLTVTVSS

STAT3_16 (SEQ ID NO: 16):

(1) QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSAAAGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTNNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLTVTVSS

STAT3_11 (SEQ ID NO: 17):

(1) EVQLVESGGGVSQAGGSLRLSAAAGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLTVTVSS

STAT3_20 (SEQ ID NO: 18):

(1) DVQLVESGGGVSQAGGSLRLSAAAGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLTVTVSS

STAT3_2 (SEQ ID NO: 19):

(1) DVQLVESGGGVSQAGGSLRLSAAAGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLTVTVSS

STAT3_15 (SEQ ID NO: 20):

(1) DVQLVESGGGVSQAGGSLRLSAAAGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLTVTVSS

STAT3_6 (SEQ ID NO: 21):

(1) HVQLVESEGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_33 (SEQ ID NO: 22):

(1) QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_17 (SEQ ID NO: 23):

(1) QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_25 (SEQ ID NO: 24):

(1) EVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMSSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_32 (SEQ ID NO: 25):

(1) DVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_13 (SEQ ID NO: 26):

(1) HVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_39 (SEQ ID NO: 27):

(1) HVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_4 (SEQ ID NO: 28):

(1) HVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

STAT3_29 (SEQ ID NO: 29):

(1) HVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREVSG
(51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCATSR
(101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQTVTVSS

Las correspondientes secuencias de ADN anti-STAT3 son como sigue:

Stat3_VHH-10 (SEQ ID NO. 30): 5'-
gatgtgcagctggtggagctctgggggagcctcggtgcaggctggaggctctctg
agactctctgtgtagcctctacatacaccggctgcatggctgggtccgccaggctcctgaaaggagcgcgaggagtcgcagctctt
agtagccgtggttttccgggactataccgactccgtgaaggccgattctccatctcccagactacgtcaagaatcggtgtatctgc
aaatgaacactgtgaacctgaggacgctgcatgtactactgtgcagcacgggaggatggagtgccgtgagacctggttgaccg
gaccgccggggccatactactggtggccaggggaccaggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-14 (SEQ ID NO. 31): 5'-caggtgcagctggtggagctctggggaggctcggtgcaggctggaggctctc
tgagactctctgtgtagcctctacatacaccggctgcatggctgggtccgccaggctcctgaaaggagcgcgaggagtcgcagct
cttagtagccgtggttttccgggactataccgactccgtgaaggccgattctccatctcccagactacgtcaagaatcggtgtatct
gcaaatgaacactgtgaacctgaggacgctgcatgtactactgtgcagcacgggaggatggagtgccgtgagacctggttgac
cggaccgccggggccatactactggtggccaggggaccctggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-12 (SEQ ID NO. 32): 5'-cagggtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatggtggtcggagctgcatgggctggttccgaggttccagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccgggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcggttgactgctatagaggtctttggttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccctggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-13 (SEQ ID NO. 33): 5'-catgtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaacgggtggtcggagctgcatgggctggttccgaggttccagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccgggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcggttgactgctatagaggtctttgttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccctggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-20 (SEQ ID NO. 34): 5'-gatgtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatggtggtcggagctgcatgggctggttccgaggttccagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccgggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcggttgactgctatagaggtctttgttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccctggtcaccgtctctca-3'

5

Stat3_VHH-23 (SEQ ID NO. 35): 5'-cagggtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgtgacctctacatacaccggctgcatgggctggttccgaggtcctctggaaaggagcgcgagggagtcgagctctttagcagccgtggtttgcccggcactataccgactccgtgaagggccgattcaccatctccgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcgacgagggagggagtgaggagtcgggtgagacctggttggacccgaccgccgggacatactactggggccaggggaccctggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-24 (SEQ ID NO. 36): 5'-gaggtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgtgacctctacatacaccggctgcatgggctggttccgaggtcctctggaaaggagcgcgagggagtcgagctctttagtagccgtggtttgcccggcactataccgactccgtgaagggccgattcaccatctccgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcgacgagggagggatggagtgccgtgagacctggttggaccgaaccgccggggccatacctactggggccaggggaccctggtcaccgtctctca-3'

10

Stat3_VHH-25 (SEQ ID NO. 37): 5'-gaggtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgtgacctctgagccaatggtggtcggagctgcatgggctggttccgaggttccagggaaggagcgcgaggggggtttctggtatttcaaccgggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggtcgttccatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgagcagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcggttgactgctatagaggtctttggttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccaggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-19 (SEQ ID NO. 38): 5'-catgtgcagctggtggagtctgggggggctcgggtgcaggctggagggtctctgaagactctcctgtgtgacctctacatacaccggctgcatgggctggttccgaggtcctctggaaaggagcgcgagggagtcgagctctttagtagccgtggtttgcccggcactataccgactccgtgaagggccgattcaccatctccgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcgacgagggagggatggagtgccgtgagacctggttggaccggaccgccggggccatacctactggggccaggggaccaggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-32 (SEQ ID NO. 39): 5'-gatgtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatggtggtcggagctgcatgggctggttccgaggttccagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccgggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcggttgactgctatagaggtctttggttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccaggtcaccgtctctca-3'

15

Stat3_VHH-33 (SEQ ID NO. 40): 5'-cagggtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatggtggtcggagctgcatgggctggttccgaggttccagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccgggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcggttgactgctatagaggtctttgttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccaggtcaccgtctctca-3'

Stat3_VHH-36 (SEQ ID NO. 41): 5'-gatgtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagactctctgaagactctcctgtgtgacctctacatacaccggctgcatgggctggttccgaggtcctctggaaaggagcgcgagggagtcgagctctttagtagccgtggtttgcccggcactataccgactccgtgaagggccgattcaccatctccgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcgacgagggagggatggagtgccgtgagacctggttggaccggaccgccggggccatacctactggggccaggggaccctggtcactgtctctca-3'

20

Stat3_VHH-11 (SEQ ID NO. 42): 5'-gtgcagctggtggagtctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatggtggtcggagctgcatgggctggttccgaggttccagggaaggagcgtgagggggtttctggtatttcaaccgggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcggttgactgctatagaggtctttgttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccctggtcactgtctctca-3'

Stat3_VHH-6 (SEQ ID NO. 43): 5'-gtgcagctgggtgagctctgagggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgaga
ctctcctgtgcagcctctggagccaatgggtgctggagctgcatgggtggtccgccaggtccagggaaggagcgcgaggggtttc
tggtatttcaaccgggtgtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctccaagacaacaccaagaacacgctgt
atctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgcatgtactactgtgcgacgagtcgggttgactgctatagaggctcttggttcaac
cgatatatgtataacagttggggccaggggaccctggtcaccgtctcctca-3'

Stat3_VHH-1 (SEQ ID NO. 44): 5'-gtgcagctgggtgagctctggggaggctcgggtgcaggctggagggtctctgaga
ctctcctgtgcagcctctggagccaatgggtgctggagctgcatgggtggtccgccaggtccagggaaggagcgcgaggggtttc
tggtatttcaaccgggtgtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcaccatctccaagacaacaccaataacacgctgt
atctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgcatgtactactgtgcgacgagtcgggttgactgctatagaggctcttggttcaac
cgatatatgtataacagttggggccaggggaccctggtcactgtctcctca-3'

- 5 Adicionalmente, la presente invención comprende uno o más anticuerpos monoclonales de ratón que se dirigen contra uno o más dominios del sdAb anti-STAT3 de la invención. El anticuerpo monoclonal de ratón puede generarse por métodos que son conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal de ratón puede producirse por un hibridoma de ratón. El anticuerpo monoclonal de ratón se puede usar en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, el anticuerpo se puede usar en un inmunoensayo como un ELISA para medir la cantidad de sdAb anti-STAT3 presente en el suero de un paciente. Debería apreciarse que el método no se limita a los sdAb anti-STAT3, y
10 podría usarse para producir un anticuerpo de ratón dirigido hacia cualquiera de los sdAb de la presente invención.

- El gen de TNF-alfa codifica una citocina proinflamatoria multifuncional que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Esta citoquina es secretada principalmente por macrófagos. La citoquina está involucrada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos, incluida la regulación del crecimiento, la diferenciación, la inflamación, la replicación viral, la tumorigénesis y las enfermedades autoinmunitarias; y en infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias. Además de inducir necrosis hemorrágica de tumores, se encontró que el TNF estaba involucrado en la tumorigénesis, metástasis tumoral, replicación viral, shock séptico, fiebre, inflamación, caquexia y enfermedades autoinmunitarias, incluida la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide, así como la
15 enfermedad de injerto contra huésped.

La presente invención proporciona sdAb, proteínas y polipéptidos que se dirigen contra el TNF-alfa, en particular contra el TNF-alfa humano dentro de la célula o membrana celular, para prevenir la secreción de TNF-alfa por las células.

- 25 Se contempla que los sdAb y polipéptidos anti-TNF-alfa de la invención se pueden usar para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados y/o mediados por TNF-alfa, tales como inflamación, artritis reumatoide, Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio del intestino, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, parotitis autoinmune, diabetes tipo 1, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus sistémico del lupus, enfermedad de Hashimoto infertilidad masculina, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis y pérdida de peso debida a cáncer y caquexia.

- 35 El TNF-alfa existe en diferentes formas; Hay formas monoméricas y multiméricas, incluyendo una forma trimérica. Está dentro del alcance de la invención que los sdAb, proteínas y polipéptidos de la invención se unen a TNF-alfa en su forma diferente, es decir, forma monomérica o formas multiméricas. Así, cuando los sdAb, proteínas y polipéptidos de la invención se dirigen a TNF-alfa, debe entenderse que esto también comprende sdAb, proteínas y polipéptidos dirigidos contra TNF-alfa en su forma trimérica.

- 40 Se sabe que la transducción de señales por TNF implica la reticulación por receptores de TNF por un trímero de moléculas de TNF, que contiene tres sitios de unión a receptores (ver, por ejemplo, Peppel et al., J. Exp. Med., 174 (1991), 1483-1489).

- 45 La proteína TNF-alfa humana recombinante se usó para generar sdAb que se dirigen contra o pueden unirse a un epítipo de TNF-alfa. Para generar los sdAb anti-TNF-alfa, el TNF-alfa humano recombinante de longitud completa (ID de gen: 7124) se expresó en Escherichia coli y se usó como el antígeno diana.

- Se obtuvieron treinta y cinco sdAb contra la proteína TNF-alfa. Estos anticuerpos anti-TNF-alfa se dividieron en tres grupos según la homología de secuencia.

- 50 La secuencia de aminoácidos de la primera sdAb anti-TNF-alfa, llamado TNF-alfa VHH66 (SEQ ID NO: 45). SdAb, se muestra a continuación:

HVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNDLKPEDTA

MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRG-QGTLVTVSS

Las tres CDR están subrayadas.

En la secuencia de aminoácidos de la segunda sdAb anti-TNF-alfa, llamado VHH69 TNF-alfa (SEQ ID NO: 46) sdAb, se muestra a continuación:

5 EVQLVESGGGSVLAGGSLRLSCVASGFTSRYNYMAWFRQAPGKERE
GVATIGTASGSADYYGSVKDRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAARTYGTISLTPSDYRYWGQGTSLTVSS

Las tres CDR están subrayadas.

10 La secuencia de aminoácidos de la tercera sdAb anti-TNF-alfa, llamado TNF-alfa VHH62 (SEQ ID NO: 47). SdAb, se muestra a continuación:

QVQLVESGGGPVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTTTTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTSLTVSS

15 Las tres CDR están subrayadas. Otros sdAb anti-TNF-alfa que se encontraron incluyen las siguientes secuencias, nuevamente con las CDR subrayadas:

TNF_2 (SEQ ID NO: 48):

QVQLVESGGGSVEAGRSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
20 GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRGQGTQTVSS

TNF_46 (SEQ ID NO: 49):

QVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
25 MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRGQGTQTVSS

TNF_71 (SEQ ID NO: 50):

QVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRGQGTQTVSS

30 TNF_21 (SEQ ID NO: 51):

QVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRGQGTQTVSS

TNF_38 (SEQ ID NO: 52):

35 EVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRGQGTQTVSS

TNF_18 (SEQ ID NO: 53):

40 EVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRGQGTSLTVSS

TNF_37 (SEQ ID NO: 54):

DVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWYAYKYRGQGTSLTVSS

TNF_66 (SEQ ID NO: 55):

HVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTLTVSS

5

TNF_68 (SEQ ID NO: 56):

HVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGLATHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTLTVSS

10

TNF_78 (SEQ ID NO: 57):

HVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAAYCMGWFRQADRKERE
GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQTVSS

15

TNF_67 (SEQ ID NO: 58):

HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFRYAAAYCMGWFRQADGKERE
GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA
MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTLTVSS

TNF_6 (SEQ ID NO: 59):

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFIDSEFGVMAWFRQAPGKERE
GVAAVYRRAGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDSA
MYYCAARTYGSVSSWTGYKYWGQGTQTVSS

20

TNF_7 (SEQ ID NO: 60):

DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFIDSEFGVMAWFRQTPGKERE
GVAAVYRRAGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDSA
MYYCAARTYGSVSSWTGYKYWGQGTQTVSS

25

TNF_13 (SEQ ID NO: 61):

DVQLVESGGGSVQVGGSLTSCAVSGYTDSYGVMAWFRQAPGKERE
GVASIYRNSGITYPDSVKGRFTISRDNAKNTVLLQMNSLKPEDSA
TYYCAVRSEFGSVSTWAGYVYWGQGTQTVSS

30

TNF_60 (SEQ ID NO: 62):

DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFIDSEFGVMAWFRQAPGKERE
GVAAVYRRAGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDSA
MYYCAARTYGSVSSWTGYKYWGRGTQTVSS

35

TNF_73 (SEQ ID NO: 63):

DVQLVESGGGSVRAGGSLRLSCTASGDTSKSDCMAWFRQAPGKERE
RVGAIYTRNGYTHYADSVNGRFTISQDNAKNALYLMMSGGLKPEDTA
MYYCAARFRIYGQCVEDDDIDYWGQGTTLTVSS

TNF_69 (SEQ ID NO: 64):

EVQLVESGGGSVLAGGSLRLSCVASGFTSRYNMAWFRQAPGKERE
GVATIGTASGSADYYGSVKDRFTISQDNAKNNTVYLQMNSLKPEDTA
MYYCAARTYGTISLTPSDYRYWGQGTTLTVSS

40

TNF_76 (SEQ ID NO: 65):

QVQVVEYGGGSVQAGETVRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHEWE
LVSNITTEGITSEASSYADSVRGRFTIFDNAKNMVYLMNSLKHEDTA
VYYCAPDPYAYSTYREYCTWAQGTQGTGLTVTVSS

TNF_62 (SEQ ID NO: 66):

QVQLVESGGGSPVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTGLTVTVSS

TNF_43 (SEQ ID NO: 67):

QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTGLTVTVSS

TNF_15 (SEQ ID NO: 68):

QVQPVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGAQGTGLTVTVSS

TNF_11 (SEQ ID NO: 69):

QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTQVTVSS

TNF_17 (SEQ ID NO: 70):

QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

TNF_63 (SEQ ID NO: 71):

QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTGLTVTVSS

TNF_20 (SEQ ID NO: 72):

HVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

TNF_58 (SEQ ID NO: 73):

EVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTGLTVTVSS

TNF_27 (SEQ ID NO: 74):

EVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTGLTVTVSS

TNF_28 (SEQ ID NO: 75):

EVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTQVTVSS

TNF_4 (SEQ ID NO: 76):

EVQLVESGGGVSQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

5

TNF_14 (SEQ ID NO: 77):

DVQLVESGGGVSQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

10

TNF_3 (SEQ ID NO: 78):

DVQLVESGGGVSQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHVCE
LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTQVTVSS

TNF_1 (SEQ ID NO: 79):

15

DVQLVESGGGVSQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGLECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSEYCTWAQGTQGTQVTVSS

TNF_45 (SEQ ID NO: 80):

20

DVQLVESGGGVSQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGLECE
LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSEYCTWAQGTQGTQVTVSS

TNF_22 (SEQ ID NO: 81):

25

DVQLVESGGGVSQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
LVSTITTEGITSVASSYYADSVRGRFTISRDNAMVYLQMNSLKPEDTA
VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

30

La inhibición del crecimiento in vitro de varios sdAb TNF-alfa se puso a prueba, como se describe a continuación. Además, la presente invención comprende uno o más anticuerpos monoclonales de ratón que están dirigidos contra uno o más dominios del sdAb anti-TNF-alfa de la invención. El anticuerpo monoclonal de ratón se puede generar por métodos que son conocidos por un experto en la técnica, como se describió anteriormente. El anticuerpo monoclonal de ratón se puede usar en ensayos de diagnóstico, como, por ejemplo, un inmunoensayo, como un ELISA, para medir la cantidad de sdAb anti-TNF-alfa presente en el suero de un paciente.

35

Las proteínas RAF son una familia de quinasas específicas de serina/treonina que sirven como intermediario central en la transmisión de señales extracelulares a la cascada de la proteína quinasa activada por mitógenos, que controla el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. BRAF es un miembro de la familia RAF que es activada por miembros de la familia Ras luego de la estimulación inducida por el factor de crecimiento. El Ras activo puede inducir la heterodimerización de cRaf y BRAF y esto puede explicar la cooperatividad observada de cRaf y BRAF en células que responden a señales de factor de crecimiento. Las mutaciones activadoras en el gen BRAF están presentes en un gran porcentaje de melanomas malignos humanos y en una proporción de cánceres de colon. La gran mayoría de estas mutaciones dan como resultado un cambio de valina a ácido glutámico en el residuo 599 dentro del segmento de activación de BRAF.

40

Los sdAb anti-BRAF se desarrollaron para dirigir el BRAF de tipo silvestre y mutado con el fin de interrumpir su función en células malignas tales como, por ejemplo, células implicadas en cáncer de colon y otras neoplasias malignas.

45

Utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica, se usó la proteína BRAF humana recombinante para generar sdAb que se dirigen contra un epítipo de BRAF o se pueden unir a él.

50

Además, la presente invención comprende uno o más anticuerpos monoclonales de ratón que están dirigidos contra uno o más dominios del sdAb anti-BRAF de la invención. El anticuerpo monoclonal de ratón puede generarse por métodos que son conocidos por un experto en la técnica. El anticuerpo monoclonal de ratón se puede usar en ensayos

de diagnóstico, por ejemplo, el anticuerpo se puede usar en un inmunoensayo como un ELISA para medir la cantidad de sdAb anti-BRAF presente en el suero de un paciente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Anti-STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) sdAb se une a STAT3

En este ejemplo, la afinidad de dos dianas VHH contra STAT3 se midió utilizando un ensayo de unión sin marcaje basado en Octet. sdAb anti-STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3), anti-KRAS (control negativo) y GST-STAT3 (antígeno monovalente de 16 kDa, Creative BioMart # STAT3-1476H) se usaron como sondas de antígeno en este ensayo. La proteína GST-STAT3 se capturó a 20 µg/ml en PBS utilizando un baño de aminopropilsilano (APS) y leyó biosensores, específicamente diseñados para proteínas hidrófobas. Luego, las sondas se sumergieron en pozos con la proteína GST-STAT3, sdAb anti-STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) o anti-KRAS en una concentración como se indica. Se midió la tasa de asociación (en la tasa) del antígeno. Los sensores se apagaron con BSA al 1% en agua. Las sondas se sumergieron en tampón de ensayo (PBS) y se midió la tasa de disociación (tasa off).

La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (KD) se determinó a partir de la constante de afinidad obtenida (KA), y KD utilizando el software de análisis de ajuste global 1:1 de Fortebio como se muestra a continuación en la Tabla 1. La afinidad se determinó promediando los valores de KD para curvas con valores de R² >0.95. El punto de datos de 250 nM anti-STAT3 VHH13 se omitió ya que es un valor atípico. Se determinó que la afinidad de sdAb anti-STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) era 1.16×10^{-7} . La afinidad de anti-KRAS VHH no fue determinada.

Tabla 1

Análisis de ajuste local, valores resaltados utilizados para determinar la afinidad que debe ser 1.16×10^{-7}							
Tipo de sensor	ID de muestra	ID de muestra de Carga	VHH Conc. (nM)	KD (M)	kon (1/Ms)	koff (1/s)	R ² Completo
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-STAT3 VHH13	STAT3 20 µg/ml	1000	1.168 E - 07	3.16E + 05	3.69E - 02	0.985
APS (Aminopropilsilano)	ANTISTAT3 VHH13	STAT3 20 µg/ml	500	1.012E - 07	4.04E + 05	4.09E - 02	0.974
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-STAT3 VHH13	STAT3 20 µg/ml	250	<1.0E - 12	4.69E + 91	5.11E - 02	0.980
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-STAT3 VHH13	STAT3 20 µg/ml	125	1.474E - 07	3.09E + 05	4.55E - 02	0.991
APS (Aminopropilsilano)	ANTI- STAT3 VHH13	STAT3 20 µg/ml	62.5	9.921E - 08	2.71E + 05	2.69E - 02	0.975
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-STAT3 VHH13	STAT3 20 µg/ml	31.3	1.53E - 06	6.75E + 04	1.03E - 01	0.656
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-kras	STAT3 20 µg/ml	1000	6.75E - 08	1.19E + 04	8.01E - 04	0.917
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-kras	STAT3 20 µg/ml	500	2.916E - 08	1.65E + 04	4.80E - 04	0.890
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-kras	STAT3 20 µg/ml	250	4.324E - 09	8.93E + 04	3.86E - 04	0.276
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-kras	STAT3 20 µg/ml	125	NA	NA	NA	NA
APS (Aminopropilsilano)	ANTI -kras	STAT3 20 µg/ml	62.5	NA	NA	NA	NA
APS (Aminopropilsilano)	ANTI-kras	STAT3 20 µg/ml	31.3	NA	NA	NA	NA

Ejemplo 2: Estudios de inmunoprecipitación

La especificidad de los sdAb de STAT3 se ensayó en células de cáncer de mama humano. En este ejemplo, las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se hicieron crecer hasta un 50% a 70% de confluencia. Luego, las células se rompieron en un tampón de lisis enfriado en hielo recién preparado (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 400 mM, NP-40 al 0.1%, glicerol al 10%, vanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 1 mM, ditiotreitolo 1 mM, 1 Fluoruro de fenilmetilsulfonilo mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina) durante 45 minutos en hielo. Luego se centrifugaron los lisados, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína utilizando un método de Lowry modificado (Bio Rad, Hercules, CA). La proteína total (1 mg) se incubó con 1.5 mg de Dynabeads (Invitrogen) con sdAb contra STAT3, un control positivo (STAT3, cat. No. SC-482, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) o

control negativo (STAT-1, Cat # 9172, Señalización celular, Danvers, Mass.) Durante 1 hora a 4°C. Luego se lavaron las perlas. Después del lavado final, se agregaron 60 µl de tampón de lisis, y el sobrenadante resultante se sometió a análisis de transferencia Western. Brevemente, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon, luego se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios apropiados. El anticuerpo anti-STAT3, usado como control positivo, fue de Cell Signaling (Cat # 4904, Danvers, Mass.). La reacción de quimioluminiscencia se realizó utilizando el sistema ECL de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas).

Como se ilustra en la FIG. 3, STAT3 endógeno inmunoprecipitado con todos los sdAb probados en cantidades variables. M es el carril Marcador que contiene el marcador, el carril 1 contenía STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) producido y aislado de células de mamífero, el carril 2 contenía STAT3 VHH14 (SEQ ID NO: 4) producido y aislado de células de mamífero, el carril 3 contenía STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) producida y aislada de células bacterianas, el carril 4 contenía STAT3 VHH14 (SEQ ID NO: 4) producida y aislada de células de mamíferos, el carril 5 fue el anticuerpo STAT3 positivo, carril 6, utilizado STAT-1 Como control negativo, no mostró banda.

Ejemplo 3: VHH13 bacteriano anti-STAT3 se une con alta afinidad a estirpes celulares STAT3 activada de forma constitutiva continua

Se ensayó la especificidad de VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) utilizando STAT3 constitutivamente activado en estirpes celulares humanas (PANC-1 y DU145) y murinas (4T1). Las células HeLa comerciales también se trataron con interferón gamma (INFT) para inducir STAT3 fosforilado. La estirpe celular nula PC-3 STAT3 se usó como control negativo.

Las células se cultivaron hasta un 50% a 70% de confluencia, luego se rompieron en un tampón de lisis enfriado en hielo recién preparado como se describió anteriormente durante 45 minutos en hielo. Luego se centrifugaron los lisados, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína como se describió anteriormente. La proteína total (1 mg) se incubó con 1.5 mg de Dynabeads (Invitrogen) que contenía el anti-STAT3 VHH13 bacteriano (SEQ ID NO: 3) o control negativo (KRAS, Creative Biolabs, Shirley, NY) durante 1 hora a 4°C. Luego se lavaron las perlas. Después del lavado final, se agregaron 60 µl de tampón de lisis y el sobrenadante resultante se sometió a un análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 2.

Como se ilustra en la FIG. 4, STAT3 endógeno fue inmunoprecipitado por VHH13 STAT3 (SEQ ID NO: 3) bacteriana en las estirpes celulares STAT3 activadas constitutivamente: PANC-1 (carril 1), DU145 (carril 2) y 4T1 (carril 4). Además, VHH13 STAT3 bacteriano (SEQ ID NO: 3) se unió al Phospho-STAT3 en el lisado de HeLa (carril 3). No se observaron bandas para PANC-1 KRAS, carril 3, y PC-3 (control negativo), carril 6.

Ejemplo 4: Estudios de citotoxicidad de sdAb anti-stat3 en estirpes celulares de cáncer mda-mb-231

En este ejemplo, los efectos antiproliferativos de los sdAb anti-STAT3 se analizaron utilizando la estirpe celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Para los experimentos, las células MDA-MB-231 se hicieron crecer hasta que alcanzaron una confluencia del 90%. En ese momento, las células se lavaron, se tripsinizaron y se contaron con un contador Coulter (Beckman, Brea, CA). Los estudios de proliferación se llevaron a cabo utilizando el ensayo de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para esto, las células se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 5×10^3 por pozo, según lo indicado por el fabricante (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Ind.). Se dejó que las células se adhirieran durante 24 horas y luego se agregaron los sdAb en las concentraciones apropiadas (es decir, 0.5, 1.0, 10.0 o 100 µg/ml). Las células se contaron el día 3. Para las células tratadas durante 5 días, los medios nuevos que contenían los sdAb se actualizaron el día 3. En el momento de la finalización, se agregaron 10 µl de reactivo MTT (0.5 mg/ml) a cada pozo, según lo indicado por el fabricante. Después de un período de incubación de 4 horas, se agregaron 100 µl de solución de solubilización y la placa se colocó en la incubadora durante la noche. Todas las placas se leyeron a una longitud de onda de 570 nm utilizando el lector de placas Biotek (Winooski, Vt.).

Todos los datos se analizaron utilizando GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California). Los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de control del vehículo utilizando ANOVA de una vía. Si se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$), se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.

Según el experimento MTT, se encontró que el sdAb bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) de VHH13 era eficaz para inhibir el crecimiento celular en los días 3 y 5 después del tratamiento, como se muestra en las Tablas 2-5 a continuación.

Tabla 2

Absorción media (570 nm) ± EE Día 3 Tratamiento posterior con sdAb anti-STAT3 en células MDA-MB-231						
Tratamiento	Control	0.5 µg/ml	1.0 µg/ml	10.0 µg/ml	100 µg/ml	valor p*
H.VHH13	0.444 ± 0.030	0.504 ± 0.043	0.545 ± 0.060	0.603 ± 0.025	0.272 ± 0.011	0.001

H.VHH14	0.404 ± 0.011	0.485 ± 0.040	0.402 ± 0.017	0.588 ± 0.020	0.416 ± 0.030	0.002
B.VHH13	0.550 ± 0.036	0.685 ± 0.018	0.716 ± 0.023	0.355 ± 0.033	0.059 ± 0.001	<0.0001
B.VHH14	0.593 ± 0.014	0.666 ± 0.022	0.644 ± 0.045	0.456 ± 0.048	0.255 ± 0.005	<0.0001
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer						

Tabla 3

Efectos del tratamiento sdAb anti-STAT3 en la proliferación celular MDA-MB-231 después de 3 días de tratamiento			
Tratamiento	µg/ml	% de inhibición	valor p*
H.VHH13	0.5		NS
	1.0		NS
	10.0		NS
	100.0	38.7	P<0.05
H.VHH14	0.5		NS
	1.0	0.5	NS
	10.0		NS
	100.0		NS
B.VHH13	0.5		NS
	1.0		NS
	10.0	35.5	P<0.001
	100.0	89.3	P<0.001
B.VHH14	0.5		NS
	1.0		NS
	10.0	23.1	P<0.05
	100.0	57.0	P<0.001
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer			

5

Tabla 4

Absorción media (570 nm) ± EE Día 5 Postratamiento con sdAb anti-STAT3 en células MDA-MB-231						
Tratamiento	Control	0.5 µg/ml	1.0 µg/ml	10.0 µg/ml	100 µg/ml	valor p*
H.VHH13	1.100 ± 0.088	0.955 ± 0.013	0.963 ± 0.018	0.832 ± 0.028	0.721 ± 0.025	0.0012
H.VHH14	0.983 ± 0.023	0.890 ± 0.021	0.935 ± 0.037	0.804 ± 0.015	0.797 ± 0.010	0.0007
B.VHH13	0.804 ± 0.046	0.761 ± 0.055	0.653 ± 0.024	0.506 ± 0.030	0.083 ± 0.005	< 0.0001
B.VHH14	0.677 ± 0.015	0.733 ± 0.038	0.794 ± 0.023	0.640 ± 0.011	0.549 ± 0.023	< 0.0001
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer						

Tabla 5

Efectos del tratamiento con sdAb anti-STAT3 en la proliferación celular MDA-MB-231 después de 5 días de tratamiento			
Tratamiento	µg/ml	% de inhibición	valor p*
H.VHH13	0.5	13.2	NS
	1.0	12.5	NS
	10.0	24.4	P<0.01
	100.0	34.5	P<0.001
H.VHH14	0.5	9.5	NS
	1.0	4.9	NS
	10.0	18.2	P<0.001
	100.0	18.9	P<0.001
B.VHH13	0.5	5.4	NS
	1.0	18.8	NS
	10.0	37.1	P<0.001
	100.0	89.7	P<0.001

B.VHH14	0.5	0	NS
	1.0	0	NS
	10.0	5.5	NS
	100.0	18.9	P<0.05
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer			

Ejemplo 5: Estudios de citotoxicidad de sdAb anti-STAT3 en líneas de cáncer de mama humana (MDA-MB-231) y pancreática (PANC-1)

- 5 En este ejemplo, se analizaron los efectos antiproliferativos de los sdAb anti-STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) y VHH14 (SEQ ID NO: 4) utilizando la estirpe celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y La estirpe celular de cáncer pancreático humano PANC-1. Para los experimentos, se cultivaron células MDA-MB-231 y PANC-1 hasta que eran confluentes al 90%. En ese momento, las células se lavaron, se tripsinizaron y se contaron con un contador Coulter (Beckman, Brea, CA). Los estudios de proliferación se llevaron a cabo utilizando el ensayo MTT descrito anteriormente. Para las células tratadas durante 5 días, los medios frescos que contenían los sdAb anti-STAT3 se actualizaron el día 3.

10 Todos los datos se analizaron usando GraphPad InStat 3. Los grupos de tratamientos se compararon con el grupo de control del vehículo utilizando ANOVA de una vía. Si se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$), se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.

15 Según el experimento MTT, se encontró que tanto el VHH13 (SEQ ID NO: 3) como el VHH14 (SEQ ID NO: 4) inhibían el crecimiento celular en las células cancerosas MDA-MB-231 y PANC-1, como se muestra en las Tablas 6-13 a continuación.

20 Tabla 6

Absorción media (570 nm) \pm EE Día 3 Postratamiento con sdAb en las células MDA-MB-231					
tratamiento	experimento	Control	10.0 μ g/ml	100 μ g/ml	valor p*
B.VHH13	1	0.550 \pm 0.036	0.355 \pm 0.033	1 0.059 \pm 0.001	<0.0001
	2	0.735 \pm 0.092	0.489 \pm 0.019	0.449 \pm 0.054	0.0355
	3	0.627 \pm 0.033	0.432 \pm 0.060	0.078 \pm 0.001	0.0002
	4	0.648 \pm 0.090	0.576 \pm 0.061	0.063 \pm 0.002	0.0011
Promedio general		0.640 \pm 0.038	0.463 \pm 0.047	0.163 \pm 0.10	0.0019
B.VHH14	1	0.593 \pm 0.014	0.456 \pm 0.048	0.255 \pm 0.005	0.0005
	2	0.624 \pm 0.046	0.499 \pm 0.018	0.357 \pm 0.019	0.0025
	3	0.816 \pm 0.088	0.502 \pm 0.048	0.308 \pm 0.021	0.0026
	4	0.729 \pm 0.051	0.559 \pm 0.041	0.287 \pm 0.021	0.0007
Promedio general		0.691 \pm 0.051	0.504 \pm 0.021	0.302 \pm 0.043	< 0.0001
* Análisis unidireccional de la variedad (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer					

Tabla 7

Absorción media (570 nm) \pm EE Día 5 Postratamiento con sdAb anti-STAT3 en células MDA-MB-231					
Tratamiento	Experimento	Control	10.0 μ g/ml	100 μ g/ml	valor p*
B.VHH13	1	0.804 \pm 0.046	0.506 \pm 0.030	0.083 \pm 0.005	< 0.0001
	2	0.561 \pm 0.024	0.417 \pm 0.011	0.266 \pm 0.015	< 0.0001
	3	0.970 \pm 0.048	0.814 \pm 0.052	0.105 \pm 0.005	< 0.0001
	4	0.757 \pm 0.118	0.665 \pm 0.036	0.087 \pm 0.004	0.011
Promedio general		0.773 \pm 0.084	0.601 \pm 0.088	0.135 \pm 0.044	0.0005
B.VHH14	1	0.677 \pm 0.015	0.640 \pm 0.011	0.549 \pm 0.023	0.0047
	2	0.456 \pm 0.037	0.338 \pm 0.023	0.274 \pm 0.032	0.0166
	3	0.983 \pm 0.019	0.930 \pm 0.044	0.578 \pm 0.039	0.0004
	4	1.092 \pm 0.053	0.842 \pm 0.052	0.499 \pm 0.036	0.0004
Promedio general		0.802 \pm 0.145	0.688 \pm 0.131	0.475 \pm 0.0690	0.2022
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer					

25

Tabla 8

Absorbancia media (570 nm) 6 S.E. Día 3: Tratamiento posterior con sdAb anti-STAT3 en las células PANC-1					
Tratamiento	Experimento	Control	10.0 μ g/ml	100 μ g/ml	valor p*
B.VHH13	1	0.756 \pm 0.045	0.432 \pm 0.015	0.307 \pm 0.012	< 0.0001

	2	1.347 ± 0.189	0.491 ± 0.087	0.169 ± 0.094	0.0019
	3	1.025 ± 0.056	0.493 ± 0.029	0.166 ± 0.028	< 0.0001
Promedio general		1.043 ± 0.171	0.472 ± 0.020	0.214 ± 0.047	0.0034
B.VHH14	1	1.541 ± 0.097	1.066 ± 0.153	0.732 ± 0.015	0.0046
	2	1.611 ± 0.119	1.353 ± 0.119	0.762 ± 0.654	0.3527
	3	1.074 ± 0.040	0.897 ± 0.154	0.700 ± 0.082	0.1092
Promedio general		1.409 ± 0.169	1.105 ± 0.133	0.731 ± 0.181	0.0238
H.VHH14	1	1.195 ± 0.205	0.920 ± 0.133	0.808 ± 0.239	0.4161
	2	1.423 ± 0.038	1.183 ± 0.114	0.993 ± 0.088	0.0338
	3	1.293 ± 0.169	1.163 ± 0.044	0.916 ± 0.088	0.1330
Media general		1.304 ± 0.066	1.089 ± 0.085	0.906 ± 0.054	0.0188
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer					

Tabla 9

Absorbancia media (570 nM) ± EE Día 5 Postratamiento con sdAb anti-STAT3 en células PANC-1					
Tratamiento	Experimento	Control	10.0 µg/ml	100 µg/ml	valor p*
B.VHH13	1	0.687 ± 0.047	0.433 ± 0.036	0.243 ± 0.024	0.0004
	2	1.670 ± 0.196	0.869 ± 0.053	0.211 ± 0.006	0.0004
	3	1.389 ± 0.044	0.627 ± 0.073	0.203 ± 0.013	< 0.0001
	Promedio general	1.249 ± 0.292	0.643 ± 0.126	0.219 ± 0.012	0.0208
H.VHH13	1	1.462 ± 0.150	1.128 ± 0.105	0.839 ± 0.117	0.0349
	2	1.792 ± 0.202	1.341 ± 0.095	0.911 ± 0.079	0.0113
	3	1.605 ± 0.289	1.161 ± 0.140	0.820 ± 0.005	0.0638
	Promedio general	1.620 ± 0.096	1.210 ± 0.066	0.857 ± 0.028	0.0007
H.VHH14	1	1.992 ± 0.105	1.859 ± 0.033	0.095 ± 0.003	< 0.0001
	2	1.517 ± 0.050	1.165 ± 0.015	1.169 ± 0.050	0.0015
	3	1.579 ± 0.134	1.081 ± 0.103	0.998 ± 0.049	0.0136
	Promedio general	1.696 ± 0.149	1.368 ± 0.247	0.754 ± 0.333	0.0967
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer					

5

Tabla 10

Inhibición media del crecimiento después de 3 días de tratamiento con sdAb anti-STAT3 en el tratamiento con proliferación celular MDA-MB-231						
Tratamiento	Experimento	Valor P ^a	10.0 µg/ml	Valor P ^b	100 µg/ml	Valor P ^b
B. VHH13	1	P< 0.0001	35.5	P< 0.001	89.3	P< 0.001
	2	P= 0.03	33.5	ns	38.9	P< 0.05
	3	P= 0.0001	3 31	P< 0.05	87.6	P< 0.001
	4	P= 0.0001	11.1	ns	90.3	P< 0.01
% de Promedio general			27.8		76.5	
Inhibición						
B.VHH14	1	P< 0.001	23.1	P< 0.05	57.0	P< 0.001
	2	P= 0.03	20.0	ns	42.8	P< 0.01
	3	P= 0.03	38.5	P< 0.05	62.3	P< 0.01
	4	P= 0.006	23.3	ns	60.6	P< 0.001
% de Promedio general			26.2		55.7	
Inhibición						
a. Análisis de varianza de una vía (ANOVA); b. Prueba posterior = prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer						

Tabla 11

Inhibición media del crecimiento después de 5 días de tratamiento con sdAb Anti-STAT3 en MDA-MB-231						
Tratamiento	Experimento	Valor P ^a	10.0 µg/ml	Valor P ^b	100 µg/ml	Valor P ^b
B.VHH13	1	P < 0.0001	37.1	P< 0.001	89.7	P< 0.001

	2	P < 0.0001	25.7	P < 0.001	52.6	P < 0.001
	3	P < 0.0001	16.1	ns	89.2	P < 0.001
	4	P = 0.001	12.2	ns	88.5	P < 0.01
% de Promedio general			22.8		80.0	
Inhibición						
B.VHH14	1	P < 0.0001	5.5	ns	18.9	P < 0.05
	2	P = 0.02	25.9	ns	39.9	P < 0.05
	3	P = 0.0004	5.4	ns	41.2	P < 0.001
	4	P = 0.0004	22.9	P < 0.05	54.3	P < 0.001
% de Promedio general			14.9		38.6	
Inhibición						

a. Análisis de varianza de una vía (ANOVA); b Prueba posterior = prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer

Tabla 12

Inhibición media del crecimiento después de 3 días de tratamiento con sdAb anti-STAT3 en la proliferación de células PANC-1						
Tratamiento	Experimento	Valor P ^a	10.0 µg/ml	Valor P ^b	100 µg/ml	Valor P ^b
B.VHH13	1	P < 0.0001	42.9	P < 0.001	59.4	P < 0.001
	2	P = 0.03	63.5	P < 0.05	87.5	P < 0.01
	3	P < 0.0001	51.9	P < 0.001	83.8	P < 0.001
% de Promedio general			52.8		76.9	
Inhibición						
H.VHH13	1	P = 0.005	30.8	P < 0.05	52.5	P < 0.01
	2	P = 0.002	16.0	ns	52.7	P < 0.01
	3	P = 0.11	16.5	ns	34.8	ns
% de Promedio general			21.1		46.7	
Inhibición						
H.VHH14	1	P = 0.42	23.0	ns	32.4	ns
	2	P = 0.03	16.9	ns	30.2	P < 0.05
	3	P = 0.13	10.1	ns	29.2	ns
% de Promedio general			16.7		30.6	
Inhibición						

a. Análisis de varianza de una vía (ANOVA); b Prueba posterior = prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer

5

Tabla 13

Inhibición media del crecimiento después de 5 días de tratamiento con sdAb anti-STAT3 en tratamiento de proliferación celular PANC-1						
Tratamiento	Experimento	Valor P ^a	10.0 µg/ml	Valor P ^b	100 µg/ml	Valor P ^b
B.VHH13	1	P = 0.0004	37.0	P < 0.01	64.6	P < 0.001
	2	P = 0.0004	48.0	P < 0.01	87.4	P < 0.001
	3	P < 0.0001	54.9	P < 0.001	85.4	P < 0.001
% de Promedio general			46.6		79.1	
Inhibición						
H.VHH13	1	P = 0.03	22.8	ns	42.6	P < 0.05
	2	P = 0.01	25.2	ns	49.2	P < 0.01
	3	P = 0.06	27.7	ns	48.9	ns
% de Promedio general			25.2		46.9	

Inhibición						
H.VHH14	1	P= 0.08	26.8	ns	14.8	ns
	2	P= 0.002	23.2	P< 0.01	22.9	P< 0.01
	3	P= 0.02	31.5	P< 0.05	36.8	P< 0.05
% de Promedio general			27.2		24.8	
Inhibición						
a. Análisis de varianza de una vía (ANOVA); b. Prueba posterior = prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer						

Ejemplo 6: Acciones antiproliferativas de sdAb STAT3 en las estirpes celulares de cáncer de próstata humano y cáncer de mama humano

5 Los efectos antiproliferativos del sdAb STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) se analizaron en la estirpe celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y las estirpes celulares de cáncer de próstata humano DU145. Para los experimentos, las células cancerosas se cultivaron hasta alcanzar el 90% de confluencia. En ese momento, las células se lavaron, se tripsinizaron y se contaron con un contador Coulter (Beckman, Brea, CA). Los estudios de proliferación se realizaron utilizando el ensayo MTT como se describió anteriormente.

10 Las propiedades antiproliferativas de sdAb VHH13 (SEQ ID NO:3) bacteriana anti-STAT3 en células MDA-MB-231 se compararon con sus acciones en células DU145. Como se muestra en la Tabla 14, las células MDA-MB-231 tratadas con los sdAb anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) mostraron una inhibición de crecimiento promedio de 29.6 y 91.2 a 50.0 y 100 µg/ml, respectivamente. En las células DU145, se observó una inhibición de crecimiento similar (31.2 y 92.1% para 50.0 y 100 µg/ml, respectivamente) como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 14

Acciones antiproliferativas de los sdAb VHH13 bacterianos anti-STAT3 en las células de cáncer de mama MDA-MB-231					
	Experimento 1 Absorbancia (% inhibición)	Experimento 2 Absorbancia (% inhibición)	Experimento 3 Absorbancia (% inhibición)	Promedio Absorbancia (%) inhibición)	valor p *
control	0.93	1.25	1.46	1.21	
50 µg	0.82 (12.0)	0.99 (20.5)	0.64 (56.2)	0.82 (32.6)	NS
100 µg	0.07 (93.1)	0.12 (90.1)	0.14 (90.5)	0.11 (91.0)	< 0.001
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer					

20

Tabla 15

Acciones antiproliferativas de sHab13 VHH13 bacteriano anti-STAT3 en células de cáncer de próstata DU145					
	Experimento 1 Absorbancia (% inhibición)	Experimento 2 Absorbancia (% inhibición)	Experimento 3 Absorbancia (% inhibición)	Promedio Absorbancia (% inhibición)	valor p *
control	1.05	1.58	1.61	1.41	
50 µg	0.68 (35.7)	1.2 (55.5)	1.03 (35.8)	0.98 (30.5)	NS
100 µg	0.13 (87.4)	0.12 (95.7)	0.06 (96.1)	0.10 (92.7)	< 0.001
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer					

Ejemplo 7: Efectos antiproliferativos de sdAb STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) en estirpes de células de cáncer de humano

25

Para probar los efectos antiproliferativos de sdAb STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) utilizando las estirpes celulares de cáncer humano: MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, BT474 y DU145 como se muestra en la Tabla 16.

30 Todas las estirpes celulares de cáncer humano se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las estirpes celulares se mantuvieron y se cultivaron en medios RPMI 1640 (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, BT474) o MEM-E (DU145) que contenían suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y 1% de solución antibiótico-antimicótica (10 unidades/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Los suministros de cultivo celular se obtuvieron de Life Technologies, Inc., (Grand Island, NY). El reactivo MTT se adquirió de Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

35

Para los experimentos, las células cancerosas se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 90%. En ese momento, las células se lavaron, se tripsinizaron y se contaron con un Contador Coulter (Beckman, Brea, CA). Los estudios de proliferación se llevaron a cabo utilizando el ensayo MTT como se describió anteriormente.

Las propiedades antiproliferativas de los sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) se evaluaron en cinco células de cáncer de mama que representan varias clasificaciones (Tabla 34). Como se muestra en la Tabla 17, todas las estirpes celulares a las 72 horas después del tratamiento mostraron una inhibición significativa del crecimiento. La mayor inhibición del crecimiento se observó a dosis de 100 y 200 µg/ml para todas las estirpes celulares. La concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) para el crecimiento en las estirpes celulares analizadas fue: 10.1 ± 2.4, 12.36 ± 1.5, 14.8 ± 1.6 y 25.2 ± 14.7 para la MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, y estirpes celulares BT474, respectivamente. Estos datos sugieren que las estirpes celulares de cáncer de mama triple negativas requieren la concentración más baja de sdAb VHH13 (SEQ ID NO: 3) para lograr la IC₅₀ en comparación con las estirpes celulares positivas de estrógeno/progesterona (es decir, MCF-7) o estirpes celulares amplificadas con HER2 (es decir, BT474).

Tabla 16

Características de la estirpe celular de cáncer de mama			
Estirpe celular	Enfermedad	Inmunoperfil	Clasificación
MDA-MB-231	Adenocarcinoma	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	Basal; Claudin-bajo
MDA-MB-468	Adenocarcinoma	ER ⁻ , PR ⁻ , Her2 ⁻	Basal
MDA-MB-453	Carcinoma metastásico	ER, PR, HER2 ⁻	Sin clasificar
BT474	Carcinoma ductal	Her2 amplificado	Luminal B
MCF-7	Adenocarcinoma	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁺	Luminal A

Tabla 17

Inhibición de estirpes celulares de cáncer de mama por sdAb anti-STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3)				
Estirpe celular	Tratamiento (µg/ml)	media de Abs	% de inhibición	valor p
BT474	0	0.634		
	0.39	0.322	49.3	P< 0.001
	0.78	0.462	27.2	P< 0.001
	1.56	0.502	20.8	P< 0.01
	3.13	0.446	29.7	P< 0.001
	6.25	0.469	26.1	P< 0.001
	12.5	0.363	42.7	P< 0.001
	25	0.256	59.6	P< 0.001
	50	0.145	77.2	P< 0.001
	100	0.046	92.8	P < 0.001
	200	0.040	93.8	P < 0.001
MCF 7	0	0.590		
	0.39	0.818	0	
	0.78	0.785	0	
	1.56	0.823	0	
	3.13	0.689	0	
	6.25	0.435	22.1	NS
	12.5	0.327	41.6	P< 0.01
	25	0.212	62.1	P< 0.001
	50	0.057	89.9	P< 0.001
estirpe celular	Tratamiento(µg/ml)	media de Abs	% de inhibición	valor p
	100	0.038	93.2	P< 0.001
	200	0.040	92.9	P< 0.001
MDA -MB-468	0	0.253		
	0.39	0.311	0	
	0.78	0.289	0	
	1.56	0.201	20.6	
	3.13	0.223	11.9	
	6.25	0.230	9.1	
	12.5	0.130	48.6	P< 0.001
	25	0.067	73.5	P< 0.001
	50	0.042	83.4	P< 0.001
	100	0.038	85.0	P< 0.001
	200	0.040	84.4	P< 0.001

MDA-MB-231	0	0.502		
	0.39	0.603	0	
	0.78	0.576	0	
	1.56	0.570	0	
	3.13	0.445	11.4	P< 0.001
	6.25	0.312	37.8	P< 0.001
	12.5	0.224	55.4	P< 0.001
	25	0.196	60.9	P< 0.001
	50	0.130	74.2	P< 0.001
	100	0.041	91.8	P< 0.001
	200	0.042	91.7	P< 0.001

Las acciones del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) también se evaluaron en la estirpe celular DU145 de cáncer de próstata humano, como se muestra en la Tabla 18. El VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) sdAb mostró una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis en todas las células cancerosas analizadas.

5

Tabla 18

Efecto de los sdAb anti-STAT3 VHH13 en estirpes celulares de cáncer de próstata				
	Tratamiento (µg/ml)	media de Abs	% de inhibición	valor p
DU145	0	0.771		
DU145	0.39	0.906	0	
DU145	0.78	1.023	0	
DU145	1.56	0.967	0	
DU145	3.13	0.783	0	
DU145	6.25	0.770	0	
DU145	12.5	0.560	27.4	P< 0.05
DU145	25	0.359	53.5	P< 0.001
DU145	50	0.161	79.1	P< 0.001
DU145	100	0.039	95.0	P< 0.001
DU145	200	0.039	95.0	P< 0.001

Ejemplo 8: Dosis máxima tolerada de VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) en ratones BALB/C

10

En este ejemplo, se ensayó la tolerancia de sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en animales de prueba utilizando la estirpe celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Para el experimento, un total de 9 ratones hembras sin pelo BALB/C (de 6 a 7 semanas de edad) se dividieron en tres grupos según el peso corporal. (Tabla 19) Los ratones (n=3) recibieron sdAb de vehículo (PBS) o VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) a 250 o 500 µg/kg de peso corporal/día durante cinco días. Durante el estudio, la mortalidad/morbilidad se realizó dos veces al día. Los pesos corporales se registraron en los días 1, 4 y 6 del estudio, así como en el día de finalización del estudio (día 13). La toxicidad se evaluó mediante mediciones del peso corporal y el comportamiento del ratón en comparación con los ratones de control del vehículo. Al finalizar la fase de tratamiento, los animales fueron seguidos durante una semana adicional para observar cualquier anomalía en el peso corporal y/o en el tratamiento de salud general.

15

20

Tabla 19

Diseño experimental del estudio de dosis máxima tolerada.					
Grupo	# Ratones	Tratamiento	Dosis	ruta	Frecuencia
1	3	PBS Vehículo	---	IP	5 días
2	3	VHH13 bacteriano	250 µg/kg bw	IP	5 días
3	3	VHH13 bacteriano	500 µg/kg bw	IP	5 días

Como se ilustra en la Tabla 20, no hubo diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos, y el sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) no se asoció con ninguna muerte relacionada con el fármaco en ninguna de las dosis. Además, no se observaron cambios de comportamiento en los animales tratados con el sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) en comparación con los ratones de control.

25

30

Tabla 20

Peso corporal medio ± EE					
Grupo	Aleatorización	Día 1	Día 4	Día 6	Día 13
Vehículo	17.1 ± 0.06	17.1 ± 0.07	17.8 ± 0.12	18.1 ± 0.09	18.8 ± 0.20

250 µg/kg	17.1 ± 0.06	17.2 ± 0.03	17.2 ± 0.15	17.5 ± 0.15	18.1 ± 0.21
500 µg/kg	17.1 ± 0.17	17.1 ± 0.09	17.8 ± 0.18	18.0 ± 0.20	18.5 ± 0.18
valor p*	> 0.9999	0.52	0.05	0.07	0.11
* Análisis de varianza de una vía (ANOVA); Prueba de comparación múltiple de Tukey Kramer					

Ejemplo 9: Actividad de anti-STAT3 VHH13 bacteriano (SEQ ID NO: 3) en xenoinjerto de ratones BALB/C sin pelo y cáncer de mama humano y células de cáncer pancreático humano

En este ejemplo, se evaluó la actividad del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en ratones utilizando la estirpe celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Brevemente, se evaluó la actividad del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) utilizando: el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y el modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano PANC-1. Los horarios de dosificación fueron los siguientes: Grupo 1 (n=6; PBS; IP) diariamente durante 14 días [QDx14]; y Grupo 2 (n=12; 500 µg/kg de peso corporal; IP), todos los días durante 14 días [QDx14]. Un período de observación de 5 días siguió a la administración del fármaco.

Las estirpes celulares de cáncer de mama humano (MDA-MB-231 y PANC-1) se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Las células MDA-MB-231 crecieron en MEM (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con FBS al 10% (Atlanta Biologicals, Flowery Branch, Ga.) Y penicilina-estreptomicina-glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY). Las células PANC-1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con FBS al 10% y penicilina-estreptomicina-glutamina. Todas las células se cultivaron en presencia de CO₂ al 5% a 37°C en una incubadora.

Se compraron ratones macho nude-Foxn1^{nu} atímicos de 4 a 5 semanas de Harlan Laboratories (Indianapolis, Indiana). Los animales se pusieron en cuarentena durante una semana y se alojaron cinco ratones por jaula, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y una humedad relativa del 50%. Se suministró agua potable y dieta a los animales a voluntad. Todos los animales se alojaron en condiciones libres de patógenos y los experimentos se realizaron de acuerdo con el Comité de Uso y Cuidado de Animales del Instituto de Investigación IIT. Para el estudio de xenoinjerto MDA-MB-231, se inyectaron subcutáneamente células (4 x 10⁶) en un volumen final de 100 µL de medio MEM en el flanco derecho de los ratones. Para el estudio de xenoinjerto PANC-1, se inyectaron subcutáneamente células (5 x 10⁶) en un volumen final de 100 µL de medio RPMI en los flancos derechos de los ratones. Las mediciones de los tumores para ambos modelos se iniciaron tan pronto como los tumores fueron palpables. A partir de entonces, los tumores se midieron dos veces por semana. Los animales se asignaron al azar cuando los tumores alcanzaron un tamaño de rango de 75 a 175 mm³, el control (n=6) y los grupos de tratamiento (n=12) se aleatorizaron utilizando el algoritmo de muestreo aleatorio estratificado. El tratamiento (VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) sdAb) o Vehículo (PBS) se inició el día siguiente a la aleatorización. El tratamiento fue bien tolerado y no se asoció con ninguna muerte relacionada con los fármacos. No se observó ninguna pérdida de peso corporal significativa.

Para el estudio de xenoinjerto MDA-MB-231, el tamaño medio del tumor de la aleatorización (± EE) fue: 103.01 ± 11.89 y 102.61 ± 9.60 para los grupos control y tratamiento, respectivamente. Los pesos corporales medios (± EE) en la asignación al azar fueron: 32.08 ± 0.76 y 30.27 ± 0.75 para el Grupo 1 y el Grupo 2, respectivamente. La tabla 21 muestra los pesos corporales medios (± EE) para todo el estudio.

Tabla 21

Peso corporal medio ± EE						
Tratamiento	Día 1	Día 6	Día 9	Día 12	Día 16	Día 20
Vehículo	31.0 ± 0.83	32.1 ± 0.76	31.9 ± 0.66	32.1 ± 0.68	32.0 ± 0.71	32.5 ± 0.88
Anti-STAT3 VHH13	29.2 ± 0.71	30.3 ± 0.75	30.4 ± 0.79	29.9 ± 0.72	30.6 ± 0.74	30.6 ± 0.77
valor p*	0.16	0.18	0.27	.09	0.28	0.17
* Prueba T de dos colas						

En el día 14 de la dosificación, el tamaño medio del tumor (± EE) para el control fue de 179.11 ± 19.39 frente a 118.86 ± 15.94 para el grupo de tratamiento. Los pesos corporales medios (± EE) a la terminación fueron: 31.98 ± 0.71 y 30.55 ± 0.74 para el Grupo 1 y el Grupo 2, respectivamente. La tabla 22 resume los volúmenes de tumores (± EE) para todo el estudio. El % de inhibición media del crecimiento tumoral en el grupo de tratamiento fue del 33.64%. Los tiempos de duplicación del tumor fueron los siguientes:

Grupo 1: 44.27 días; y Grupo 2: 61.06 días. La figura 5 ilustra la inhibición del crecimiento del sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231. El sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) mostró una inhibición significativa del crecimiento (p= 0.047). Por lo tanto, el sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) tiene actividad quimioterapéutica en el sistema modelo de cáncer de mama humano MDA-MB-231.

Tabla 22

Mediciones de tumores individuales (mm ³) para el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231							
Grupo	animal #	Día 1	Día 6	Día 9	Día 12	Día 16	Día 20
1	1	117.43	141.72	135.00	139.31	127.93	133.19
	2	130.30	142.83	206.15	256.99	244.06	243.00
	3	78.00	105.97	114.04	144.06	154.50	158.94
	4	118.24	162.41	171.39	225.59	181.32	217.97
	5	71.10	109.03	133.13	168.80	187.73	164.45
Media		103.01	132.39	151.94	186.95	179.11	183.51
E.E.		11.89	10.82	16.42	23.28	19.39	20.28
2	6	123.94	114.91	129.22	176.04	170.09	162.98
	7	85.93	101.06	112.60	112.24	139.56	96.43
	8	147.34	148.72	169.69	185.08	170.07	256.71
	9	115.91	103.64	108.37	141.21	144.51	119.42
	10	73.23	82.59	110.13	91.22	166.77	285.88
	11	163.73	178.23	183.79	165.52	214.28	129.51
	12	75.54	83.94	103.68	119.88	104.26	99.48
	13	70.04	89.24	102.60	75.25	57.65	95.23
	14	101.62	65.09	82.02	68.01	61.41	61.83
	15	67.83	62.21	59.00	77.04	65.49	82.73
	16	131.93	75.28	76.21	53.55	73.66	51.61
	17	74.28	109.06	111.92	89.94	58.56	100.07
Grupo	animal #	Día 1	Día 6	Día 9	Día 12	Día 16	Día 20
Media		102.61	101.16	112.44	112.92	118.86	128.49
E.E.		9.6	9.8	10.3	12.9	15.9	21.1
Valor de p		0.98	0.08	0.06	0.01	0.05	0.14

Para el estudio de xenoinjerto PANC-1, los tamaños medios de la aleatorización (+ EE) del tumor fueron 107.01 ± 4.54 en el control y 110.58 ± 6.18 en los grupos de tratamiento. Los pesos corporales medios (\pm EE) en la asignación al azar fueron: 29.0 ± 0.81 y 28.5 ± 0.70 para el Grupo 1 y el Grupo 2, respectivamente. Los pesos corporales medios (\pm EE) a la terminación fueron: 31.2 ± 0.99 y 30.1 ± 0.75 para el Grupo 1 y el Grupo 2, respectivamente. La Tabla 23 resume los pesos corporales medios (\pm EE) para todo el estudio. En el día 14 de la dosis, el tamaño medio del tumor (\pm EE) para el control fue 287.30 ± 33.94 versus 318.74 ± 29.76 para el grupo de tratamiento. La Tabla 24 resume los volúmenes de tumores (\pm EE) para todo el estudio.

Tabla 23

Peso corporal promedio \pm E.E.						
Tratamiento	2/19	2/24	2/27	3/2	3/6	3/10
Control del vehículo	31.0 ± 0.83	32.1 ± 0.76	31.9 ± 0.66	32.1 ± 0.68	32.0 ± 0.71	32.5 ± 0.88
Anti-STAT3	29.2 ± 0.71	30.3 ± 0.75	30.4 ± 0.79	29.9 ± 0.72	30.6 ± 0.74	30.6 ± 0.77

Los tiempos de duplicación del tumor fueron los siguientes: Grupo 1: 22.44 días; y Grupo 23.02 días. El sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) no mostró una inhibición significativa del crecimiento en el sistema de modelo de cáncer pancreático humano PANC-1.

Tabla 24

Mediciones de tumores individuales (mm ³) para el modelo de xenoinjerto PANC-1							
Grupo	Animal #	2/19	2/24	2/27	3/2	3/6	3/10
1	1	99.77	117.96	134.67	161.27	160.79	195.58
	2	117.54	137.14	221.14	241.27	303.70	321.45
	3	120.30	210.99	276.05	322.17	394.96	732.07
	4	111.65	135.91	215.87	340.97	334.08	382.06
	5	90.88	96.35	165.26	156.28	223.17	314.97
	6	107.05	156.56	192.98	324.34	307.13	573.99
Media		107.87	142.49	201.00	257.72	287.30	420.02
E.E.		11.11	16.01	20.00	34.35	33.94	80.34
2	7	96.31	193.71	275.06	317.53	395.37	540.66
	8	89.24	90.03	112.43	125.51	189.63	235.08
	9	80.62	148.97	196.38	187.24	299.84	530.46
	10	108.03	144.14	234.46	240.39	288.75	421.61
	11	77.66	116.21	313.19	290.38	411.66	197.67
	12	129.68	143.20	290.67	224.92	261.44	343.04

	13	108.99	182.30	239.00	254.64	342.19	464.00
	14	123.27	171.03	223.34	226.88	248.69	324.30
	15	144.53	136.03	198.47	226.04	247.97	273.58
	16	120.96	136.48	226.43	338.06	564.71	883.81
	17	112.69	144.76	167.12	225.70	223.06	326.19
	18	134.95	189.64	193.14	248.01	351.63	364.44
Media		110.58	149.71	222.47	242.11	318.74	408.74
E.E.		6.18	8.79	15.90	16.30	29.76	53.25
Valor de p		0.78	0.67	0.43	0.64	0.53	0.91

Ejemplo 10: Estudio de xenoinjerto MDA-MB-231

En este ejemplo, se evaluó adicionalmente la eficacia del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto de mama humana MDA-MB-231. Los horarios de dosificación fueron los siguientes: Grupo 1 (n=4; PBS; IP) dos veces al día durante 14 días [BIDx14]; Grupo 2 (n=4; 1 mg/kg de peso corporal; IP), dos veces al día durante 14 días [BIDx14]; Grupo 3 (n=4; 2 mg/kg de peso corporal; IP) dos veces al día durante 14 días [BIDx14]; y Grupo 4 (n=4; 2 mg/kg de peso corporal; IP) una vez al día durante 14 días [QDx14]. Un período de observación de 7 días siguió a la administración.

Las estirpes celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y los ratones hembra sin pelo atímicos-Foxn1^{nu} se describieron anteriormente.

Las células MDA-MB-231 a una densidad de 5×10^6 se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a un volumen final de 100 μ l en medio MEM. Las mediciones del tumor se iniciaron tan pronto como los tumores fueron palpables. A partir de entonces, los tumores se midieron dos veces por semana. Los animales se asignan al azar cuando los tumores alcanzan un tamaño de rango de 55 a 150 mm³ utilizando el algoritmo de muestreo aleatorio estratificado. El tratamiento (VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) sdAb) o Vehículo (PBS) se inició el día siguiente a la aleatorización.

El tamaño medio del tumor de la aleatorización (\pm EE) fue: 92.08 ± 13.24 , 82.38 ± 5.17 , 77.47 ± 7.17 y 104.71 ± 14.64 para los Grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 25, los pesos corporales medios (\pm EE) en la asignación al azar fueron: 23.65 ± 0.72 , 23.45 ± 0.66 , 23.10 ± 0.20 y 22.45 ± 1.25 para los Grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 26, en el día 14 de la dosis, el tamaño promedio del tumor (\pm EE) para el grupo de control fue de 221.51 ± 57.32 versus 67.12 ± 10.66 , 58.27 ± 22.54 y 131.44 ± 22.86 , para el grupo de tratamiento 2, 3, y 4, respectivamente. En el momento de la terminación (día 42), el tamaño medio del tumor (\pm EE) era: 255.42 ± 65.46 , 55.98 ± 6.94 , 41.15 ± 13.21 y 145.51 ± 52.32 , para los grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Los pesos corporales medios (\pm EE) a la terminación fueron: 24.80 ± 0.49 , 23.25 ± 1.20 , 24.00 ± 0.32 y 23.2 ± 1.46 para los grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. El % medio máximo de pérdida de peso neto (día) fue: 0.7 (36), 1.5 (23), 1.8 (36) y 2.2 (29) para los Grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

También como se muestra en la Tabla 26, la inhibición media del crecimiento en los grupos de tratamiento fue de 78.3, 75.2 y 55.9, para los Grupos 2, 3 y 4, respectivamente. Los tiempos de duplicación del tumor fueron: Grupo 1: 20.56 días; Grupo 2: 34.54 días; Grupo 3: 30.07 días; y Grupo 4: 27.17 días. Hubo un retraso en el crecimiento de 13.99, 9.52 y 6.61 días para los grupos 2, 3 y 4, respectivamente. Los valores de % de tratamiento/control para los grupos de tratamiento fueron: grupo 2: -33.75 (estasis tumoral); Grupo 3: -54.4 (regresión tumoral); y Grupo 4: 10.28 (inhibición tumoral). La Figura 6 ilustra la inhibición del crecimiento de sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231.

La administración de sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) se asoció con una inhibición significativa del crecimiento en el Grupo 2 ($p=0.02$) [1 mg/kg; BID \times 14] y Grupo 3 ($p=0.02$) [2 mg/kg; BID \times 14]. Además, tres de cada cuatro tumores mostraron una regresión significativa. Sobre la base de estos datos, se concluye que el sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) tiene actividad quimioterapéutica en el sistema modelo de cáncer de mama humano MDA-MB-231.

Tabla 25

		Peso medio corporal \pm EE						
		Fecha/día de estudio						
		Dosis					Recuperación	
		6/23	6/26	6/29	7/2	7/6	7/9	7/15
grupo	Programa	20	23	26	29	33	36	42
1	PBS; BID \times 14	23.65 ± 0.72	23.85 ± 0.60	24.18 ± 0.67	24.05 ± 0.63	24.30 ± 0.67	24.13 ± 0.72	24.80 ± 0.49

ES 2 731 876 T3

2	1 mg/kg; BID × 14	23.45 ± 0.66	23.10 ± 0.68	23.13 ± 0.74	23.13 ± 0.95	23.08 ± 1.01	23.13 ± 1.09	23.25 ± 1.20
3	2 mg/kg; BID × 14	23.10 ± 0.20	23.10 ± 0.14	23.20 ± 0.07	23.85 ± 0.39	23.80 ± 0.24	23.38 ± 0.23	24.00 ± 0.32
4	2 mg/kg; QD × 14	22.45 ± 1.25	22.35 ± 1.32	22.58 ± 1.46	22.08 ± 1.44	22.73 ± 1.47	22.55 ± 1.46	23.20 ± 1.38

Tabla 26

Mediciones de tumores individuales (mm ³) para el Xenoinjerto de MDA-MB-231								
Grupo 1	Anima l #	6/23/15(20)	6/26/15(23)	6/29/15(26)	7/2/15(29)	7/6/15(33)	7/9/15(36)	7/15/15(42)
	001	93.38	119.07	159.80	197.91	210.95	243.31	265.61
	002	116.07	241.31	313.16	339.13	362.30	390.48	426.32
	003	55.67	83.45	98.22	135.50	198.19	204.96	218.29
	004	104.82	112.09	118.44	111.07	114.61	115.31	111.45
Media absoluta		92.49	138.98	172.41	195.90	221.51	238.51	255.42
media relativa		100.00%	150.27%	186.41%	211.82%	239.51%	257.89%	276.17%
EE media		13.12	34.97	48.64	51.12	51.56	57.32	65.46
% de Media de inhibició n								
Mediana absoluta		99.10	115.58	139.12	166.71	204.57	224.13	241.95
Mediana Relativa		100.00%	116.62%	140.38%	168.22%	206.42%	226.16%	244.14%
E.E. Mediana		13.66	37.49	52.30	53.83	52.48	57.91	65.92
% de mediana de inhibició n								
Grupo 2	Anima l #	6/23/15(20)	6/26/15(23)	6/29/15(26)	7/2/15(29)	7/6/15(33)	7/9/15(36)	7/15/15(42)
	005	73.15	54.54	59.17	57.21	56.20	37.13	39.17
	006	80.11	76.56	80.34	88.75	99.09	87.42	72.18
	007	97.22	79.99	78.44	59.90	55.90	53.66	60.35
	008	81.21	53.58	54.34	67.43	57.30	29.02	52.23
Media Absoluta		82.92	66.17	68.07	68.32	67.12	51.81	55.98
Media relativa		100.00%	79.79%	82.09%	82.39%	80.95%	62.48%	67.51%
EE de la media		5.09	7.03	6.62	7.14	10.66	12.93	6.94
% de inhibició n media		10.34%	52.39%	60.52%	65.12%	69.70%	78.28%	78.08%
Mediana Absoluta		80.66	65.55	68.80	63.66	56.75	45.40	56.29
Mediana relativa		100.00%	81.27%	85.30%	78.93%	70.36%	56.28%	69.79%
EE Mediana		5.25	7.04	6.63	7.63	12.23	13.45	6.94
% De inhibició n mediana		18.61%	43.28%	50.54%	61.81%	72.26%	79.75%	76.74%
Grupo 3	Anima l #	6/23/15(20)	6/26/15(23)	6/29/15(26)	7/2/15(29)	7/6/15(33)	7/9/15(36)	7/15/15(42)

	009	56.41	43.61	33.13	31.76	34.11	50.33	18.94
	010	84.06	85.18	61.75	80.69	110.72	89.11	73.89
	011	82.87	54.78	34.92	54.38	78.47	78.68	51.30
	012	86.73	44.01	23.09	16.99	9.78	18.71	20.48
Media Absoluta		77.52	56.89	38.22	45.95	58.27	59.21	41.15
Media Relativa		100.00%	73.39%	49.31%	59.28%	75.17%	76.38%	53.09%
EE de la media		7.08	9.78	8.26	13.90	22.54	15.79	13.21
% de media de inhibición		16.19%	59.06%	77.83%	76.54%	73.69%	75.18%	83.89%
Mediana Absoluta		83.46	49.39	34.02	43.07	56.29	64.51	35.89
Mediana Relativa		100.00%	59.18%	40.76%	51.60%	67.44%	77.29%	43.00%
S.E. La mediana		7.87	10.69	8.61	14.00	22.56	16.08	13.56
% de mediana de inhibición		15.78%	57.27%	75.54%	74.17%	72.49%	71.22%	85.17%
Grupo 4	Anima l #	6/23/15(20)	6/26/15(23)	6/29/15(26)	7/2/15(29)	7/6/15(33)	7/9/15(36)	7/15/15(42)
	013	88.56	108.35	105.80	102.94	183.39	159.78	291.06
	014	78.73	51.51	54.20	70.39	84.29	55.83	42.03
	015	113.20	85.29	69.30	103.16	103.20	87.15	130.64
	016	141.91	130.82	87.49	145.68	154.89	117.63	118.31
Media Absoluta		105.60	93.99	79.20	105.54	131.44	105.10	145.51
Media Relativa		100.00%	89.01%	75.00%	99.94%	124.47%	99.52%	137.79%
E.E. de la media		14.11	16.94	11.18	15.44	22.86	22.17	52.32
% de Media de inhibición		-14.18%	32.37%	54.06%	46.13%	40.66%	55.94%	43.03%
Mediana Absoluta		100.88	96.82	78.40	103.05	129.05	102.39	124.47
Mediana relativa		100.00%	95.98%	77.71%	102.15%	127.92%	101.49%	123.38%
EE mediana		14.37	17.02	11.19	15.50	22.90	22.22	53.72
% de Mediana de inhibición		-1.80%	16.23%	43.65%	38.19%	36.92%	54.32%	48.55%

Ejemplo 11: Eficacia de la sdAb anti-STAT3 bacteriana VHH13 (SEQ ID NO: 3) en tres modelos de cáncer de xenoinjerto humano

- 5 En este Ejemplo, se evaluó la eficacia del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en los modelos de xenoinjerto de cáncer de próstata MDA-MB-231 de Mama Humana, PANC-1 y DU145.

Los ratones Athymic Nude-Foxn1^{nu}, las células de cáncer de mama MDA-MB-231, el cáncer pancreático PANC-1 y las estirpes celulares de cáncer de próstata DU145 se describieron anteriormente. El peso corporal de los ratones varió de 17 a 19 g (34 hembras) y de 21 a 23 g (16 machos) en el día 1 del estudio.

Las células en pasajes tempranos (4 a 10) se usaron para la implantación en los ratones y se recogieron durante el crecimiento de la fase logarítmica. MDA-MB-231 (5×10^6), DU145 (5×10^6) y PANC-1 (1.5×10^6) se inyectaron

subcutáneamente en el flanco derecho de los ratones en un volumen final de 100 µl de medio. Las mediciones del tumor se iniciaron tan pronto como los tumores fueron palpables. A partir de entonces, los tumores se midieron dos veces por semana.

5 Los animales se aleatorizaron utilizando el algoritmo de muestreo aleatorio estratificado cuando los tumores alcanzan un tamaño de rango de: 74-120 mm³ (MDA-MB-231), 89-146 mm³ (DU145), o 60-160 mm³ (PANC-1). El tratamiento (que contiene el sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) y denominado aquí SBT-100) o Vehículo (PBS) se inició el día siguiente a la aleatorización, denominado día 1.

10 El sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) se suministró como una solución preformulada a una concentración de 0.651 mg/ml y se almacenó a -20°C hasta que esté listo para su uso. La solución de reserva se diluyó en PBS estéril a pH 7.6 para proporcionar 5 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 ml/kg. La solución de trabajo se preparó cada 7 días, se dividió en alícuotas en siete viales y se almacenó a 4°C. En cada día de tratamiento, solo el vial necesario se llevó a temperatura ambiente. Todo el material sdAb sobrante se conservó a 4°C según se necesite para la siguiente dosis. El día 8, se descartó cualquier material sdAb restante y se preparó un lote nuevo.

15 Se administraron dos grupos (control y SBT-100) de ratones por modelo de tumor de acuerdo con el protocolo que se muestra en la Tabla 27. Los horarios de dosificación fueron los siguientes: Grupo 1 (n=4; PBS) dos veces al día durante 14 días [BIDx14]; Grupo 2 (n=4; SBT-100, 5 mg/kg de peso corporal), dos veces al día durante 14 días [BIDx14]. Tanto el vehículo (PBS pH 7.6) como el SBT100 se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces al día, con seis horas de diferencia durante catorce días. La dosificación se realizó de acuerdo con los pesos individuales de los animales. Un período de recuperación de 7 días siguió a la administración.

Tabla 27

Diseño experimental del estudio de xenoinjerto

Modelo	# de células inoculadas/ratón	Grupo	# Ratón	Agente	Dosis (mg/Kg)	Ruta	Programa
MDA-MB-231	5 × 10 ⁸	1	4	Control (PBS)	0	IP	BID × 14
		2	4	SBT-100	5	IP	BID × 14
PANC-1	1.5 × 10 ⁸	1	4	Control (PBS)	0	IP	BID × 14
		2	4	SBT-100	5	IP	BID × 14
DU145	5 × 10 ⁸	1	4	Control (PBS)	0	IP	BID × 14
		2	4	SBT-100	5	IP	BID × 14

25 Study Log Study Director Animal Study Management Software (San Francisco, California) se usó para aleatorizar animales, recopilar datos (por ejemplo, dosis, pesos corporales, mediciones de tumores, observaciones clínicas), y realizar análisis de datos.

30 En el modelo de xenoinjerto de tumor MDA-MB-231, los animales se asignaron al azar el día 23 después de la inoculación con un tamaño de tumor medio (± EE) de: 77.98 ± 21.58 y 84.71 ± 5.56 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Los pesos corporales medios (± EE) en la asignación al azar fueron: 20.04 ± 0.62 y 23.7 ± 1.84 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. La Tabla 28 resume los pesos corporales medios (± EE) para todo el estudio. En el último día de la dosis (día 14), el tamaño medio del tumor (± EE) para el grupo de control fue 168.28 ± 51.57 versus 83.81 ± 22.65 para los ratones tratados con SBT-100. La Tabla 29 resume los volúmenes de tumores (± EE) para todo el estudio. En el momento de la terminación (día 28), el tamaño medio del tumor (± EE) era: 270.49 ± 112.35 y 91.72 ± 33.17, para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Los pesos corporales medios (± EE) a la terminación fueron: 25.36 ± 1.07 y 24.25 ± 1.68 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Al final del estudio, la inhibición media del crecimiento tumoral en el grupo tratado con SBT-100 fue del 85.8% (p=0.006). La figura 7 ilustra el volumen medio del tumor. Los tiempos de duplicación del tumor fueron 25.78 días versus 111.6 días para el Grupo 1 y el Grupo 2, respectivamente. El % de tratamiento/control para el Grupo 2 fue 13.35 (inhibición del tumor).

Tabla 28

Pesos corporales medios para ratones en MDA-MB-231

Grupo	Animal ID	fase						
		8/28	9/1	Dosis 9/4	9/8	9/11	Recuperación 9/15	9/18
Control	001	23.40	24.80	24.60	25.00	24.70	23.30	25.10
control	002	22.40	22.50	22.60	22.70	22.80	20.60	23.10
control	003	23.70	24.80	25.20	24.80	24.30	23.30	25.20

control	004	23.70	24.70	25.10	25.30	24.90	22.90	25.40
media		23.30	24.20	24.38	24.45	24.18	22.53	24.70
mediana		23.55	24.75	24.85	24.90	24.50	23.10	25.15
DE		0.62	1.13	1.21	1.18	0.95	1.30	1.07
% Cambio		0.00	3.82	4.56	4.89	3.73	-3.38	5.97
SBT- 100	005	21.70	21.70	21.70	22.40	22.60	21.40	22.20
SBT-100	006	25.00	24.30	24.30	24.70	25.30	24.40	25.00
SBT-100	007	22.60	23.00	23.10	23.10	23.80	22.80	23.70
SBT-100	008	25.50	25.30	25.50	26.10	25.80	25.60	26.10
Media		23.7	23.575	23.65	24.075	24.375	23.55	24.25
Mediana		23.8	23.65	23.7	23.9	24.55	23.6	24.35
DE		1.84	1.56	1.63	1.66	1.46	1.84	1.68
% Cambio		0.00	-0.45	-0.15	1.65	2.96	-0.63	2.38

Tabla 29

Volúmenes tumorales para MDA-MB-231

Grupo	Animal ID	Fase									
		Pre-dosis			Dosis					Recuperación	
		8/21	8/24	8/27	8/28	9/1	9/4	9/8	9/11	9/15	9/18
Control	001	51.00	55.80	80.94	76.35	83.66	94.11	110.78	129.99	162.81	184.15
Control	002	75.19	77.22	121.13	120.73	145.12	179.21	203.16	234.05	308.70	428.44
control	003	57.04	57.81	75.32	81.06	93.25	114.27	181.87	242.88	295.93	408.67
control	004	42.92	51.67	106.54	92.23	116.96	142.60	191.58	213.48	296.91	303.19
Media		56.54	60.63	95.98	92.59	109.75	132.55	171.84	205.10	263.59	331.11
Mediana		54.02	56.80	93.74	86.64	105.10	128.44	186.72	223.76	291.42	355.93
DE		13.71	11.36	21.58	19.91	27.42	36.92	41.83	51.57	67.78	112.35
SBT-100	005	72.26	64.45	80.02	74.07	56.81	49.44	68.70	73.64	93.32	116.07
SBT-100	006	61.50	63.06	80.67	78.60	71.92	67.06	67.54	115.80	116.97	120.44
SBT-100	007	37.41	35.15	91.93	91.85	50.02	50.32	46.10	63.85	66.57	80.57
SBT-100	008	43.80	56.96	86.22	79.94	69.23	60.19	54.10	82.57	79.47	49.78
Media		53.74	54.91	84.71	81.37	59.49	56.76	64.11	83.81	89.08	91.72
mediana		52.65	60.02	83.45	79.77	58.02	55.25	61.40	77.81	86.40	98.32
DE		18.00	13.57	5.56	7.49	9.16	0.43	18.21	22.65	21.56	33.17
% T/C		0.0	32.3	84.0	81.6	13.6	5.9	9.2	20.7	17.6	13.4
valor p		0.800	0.542	0.351	0.332	0.013	0.007	0.003	0.005	0.003	0.006

En el modelo de xenoinjerto de tumor DU145, los animales se asignaron al azar el día 17 después de la inoculación con un tamaño de tumor medio (\pm EE) de: 111.87 ± 20.53 y 111.23 ± 25.16 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Los pesos corporales medios (\pm EE) en la asignación al azar fueron: 29.10 ± 1.94 y 30.68 ± 1.56 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. La tabla 30 resume los pesos corporales medios (\pm EE) para todo el estudio. En el último día de la dosis (día 14), el tamaño medio del tumor (\pm EE) para el grupo de control fue 621.81 ± 276.25 versus 364.14 ± 51.64 para los ratones tratados con SBT-100. La Tabla 31 resume los volúmenes de tumores (\pm EE) para todo el estudio. En el momento de la terminación (día 28), el tamaño medio del tumor (\pm EE) fue de 819.42 ± 351.88 y 601.83 ± 131.51 , para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Los pesos corporales medios (\pm EE) a la terminación fueron: 29.20 ± 2.33 y 29.60 ± 1.04 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Al final del estudio, la inhibición media del crecimiento tumoral en el grupo tratado con SBT-100 fue del 26.6% ($p=0.29$). La figura 8 ilustra el volumen medio del tumor. Los tiempos de duplicación del tumor fueron 14.57 días versus 18.19 días para el Grupo 1 y el Grupo 2, respectivamente. El % de tratamiento/control para el Grupo 2 fue de 74.8.

Tabla 30

Pesos corporales medios para los ratones en DU145

Grupo	Animal ID	Fase						
		Dosis			Recuperación			
		9/4	9/8	9/11	9/15	9/18	9/22	9/25
Control	001	29.60	28.10	29.30	28.40	28.30	29.00	29.90
control	002	29.70	30.10	31.20	30.10	30.40	29.90	30.00
control	003	30.80	30.10	31.00	31.70	31.20	31.10	31.10
control	004	26.30	25.70	26.60	25.20	26.10	26.20	25.80
media		29.10	29.50	29.53	28.85	29.00	29.05	29.20

mediana		29.65	29.10	30.15	29.25	29.35	29.45	29.95
DE		1.94	2.09	2.13	2.78	2.29	2.09	2.33
% de cambio		0.00	- 2.07	1.46	-0.99	-0.37	-0.19	0.27
SBT-100	005	30.90	30.20	27.90	29.80	29.90	30.50	30.10
SBT-100	006	28.40	26.20	27.30	26.90	27.50	29.10	28.50
SBT-100	007	31.70	31.20	31.50	30.40	30.70	31.20	30.80
SBT-100	008	31.70	29.70	30.20	28.20	28.10	28.80	29.00
Media		30.68	29.33	29.23	28.83	29.05	29.90	29.60
mediana		31.30	29.95	29.05	29.00	29.00	29.80	29.55
DE		1.56	2.17	1.97	1.58	1.50	1.14	1.04
% Cambio		0.00	-4.47	-4.74	-6.00	-5.23	-2.39	-3.40

Tabla 31

Volúmenes tumorales para fase DU145

Grupo	ID de Anim al	8/24	Pre-dosis					Fase Dosis			Recuperación	
			8/31	8/3	9/3	9/4	9/8	9/11	9/15	9/18	9/22	9/25
Control	001	38.18	41.27	38.41	82.60	83.22	121.16	203.79	310.41	409.15	430.31	450.69
Control	002	45.05	35.99	64.98	96.50	103.83	135.42	225.62	327.76	478.14	534.48	599.97
control	003	49.65	22.37	88.76	127.98	141.49	213.24	334.15	930.74	1.023.13	1.084.00	1.188.93
control	004	17.06	36.44	86.73	131.20	138.33	227.23	289.78	338.79	576.83	926.90	1.027.90
Media		38.98	34.02	64.47	111.87	119.22	174.26	275.84	476.93	621.81	743.95	819.42
Mediana		42.11	36.22	65.36	111.74	121.98	174.33	257.70	333.27	527.49	730.59	813.93
SD		13.67	8.12	20.58	20.53	24.32	53.70	30.91	302.77	276.25	311.67	351.38
SBT-100	005	33.80	23.32	35.67	36.02	88.21	151.22	146.67	386.82	325.88	474.31	456.83
SBT-100	006	59.44	41.00	64.21	98.56	121.39	148.44	208.10	357.62	391.02	518.25	588.67
SBT-100	007	42.20	35.11	77.90	144.66	145.78	115.05	106.70	248.12	316.24	454.78	528.83
SBT-100	008	63.37	50.18	71.23	116.28	118.70	134.16	147.52	320.22	423.45	604.72	793.96
Media		51.23	37.40	59.75	111.23	137.39	151.50	328.22	118.77	364.14	513.01	601.83
Mediana		50.87	38.06	107.42	62.72	107.42	120.05	141.30	146.50	338.92	496.20	558.76
SD		15.13	11.25	18.90	25.18	23.17	16.78	40.98	59.97	51.64	66.65	131.51
% T/C		0.0	-26.8	29.1	78.8	81.7	65.4	42.1	70.6	56.9	69.9	74.8
valor p		0.226	0.643	0.747	0.970	0.990	0.238	0.034	0.372	0.115	0.197	0.291

En el modelo de xenoinjerto de tumor PANC-1, los animales se asignaron al azar el día 22 después de la inoculación con un tamaño de tumor medio (\pm EE) de: 78.74 ± 40.21 y 93.84 ± 36.31 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Los pesos corporales medios (\pm EE) en la asignación al azar fueron: 22.50 ± 1.47 y 24.23 ± 1.63 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. La Tabla 32 resume los pesos corporales medios (\pm EE) para todo el estudio. En el último día de la dosis (día 14), el tamaño medio del tumor (\pm EE) para el grupo de control fue de 204.95 ± 178.90 versus 159.03 ± 28.01 para los ratones tratados con SBT-100. La Tabla 33 resume los volúmenes de tumores (\pm EE) para todo el estudio. En el momento de la terminación (día 28), el tamaño medio del tumor (\pm EE) fue de 284.77 ± 288.88 y 203.02 ± 30.34 , para los grupos 1 y 2, respectivamente. Los pesos corporales medios (\pm EE) a la terminación fueron: 27.38 ± 1.07 y 26.23 ± 1.19 para los Grupos 1 y 2, respectivamente. Al final del estudio, la inhibición media del crecimiento tumoral en el grupo tratado con SBT-100 fue del 41.78% ($p=0.35$). La figura 9 ilustra el volumen medio del tumor. Los tiempos de duplicación del tumor fueron 18.51 días versus 35.70 días para el Grupo 1 y el Grupo 2, respectivamente. El % de tratamiento/control para el Grupo 2 fue de 52.79.

Tabla 32
Pesos corporales medios para ratones en la PANC-1

Grupo	ID de Animal	Fase						
		9/9	9/11	Dosis 9/15	9/18	9/22	Recuperación	
Control	001	26.50	26.60	25.60	27.10	25.70	26.10	27.20
Control	002	24.30	24.60	23.90	25.10	24.40	25.00	25.60
control	003	27.60	26.50	26.30	26.20	26.10	27.60	28.20
control	004	25.10	25.30	24.20	25.10	24.70	25.90	26.90
media		22.50	22.80	23.04	24.30	24.58	25.90	27.38
mediana		25.60	25.90	25.00	25.65	25.20	26.00	27.05
DE		1.47	0.97	1.18	0.97	0.81	1.03	1.07
% Cambio		0.00	-0.39	-3.15	0.12	-2.41	1.05	4.33
SBT-100	005	22.60	22.80	21.40	22.60	22.60	22.90	24.60
SBT-100	006	26.00	25.10	24.90	25.70	25.10	25.40	27.10
SBT-100	007	23.10	22.30	22.40	22.70	23.10	23.50	25.70
SBT-100	008	26.20	26.00	25.20	25.40	26.20	25.40	27.30
Media		24.23	23.80	23.48	24.08	24.25	24.30	26.23
mediana		24.15	23.90	23.65	24.05	24.10	24.45	26.40
DE		1.63	1.46	1.87	1.71	1.69	1.29	1.19
% Cambio		0.00	-1.71	-3.14	-0.63	0.13	0.39	8.39

5

Tabla 33
Volúmenes tumorales para PANC-1

Grupo	Animal ID	Fase									
		Pre-dosis			Dosis					Recuperación	
		8/31	9/3	9/6	9/9	9/11	9/15	9/18	9/22	9/25	9/29
Control	001	54.91	56.79	94.23	94.37	94.69	123.90	136.77	206.74	220.31	223.91
Control	002	46.38	75.43	81.99	81.62	88.44	130.01	161.06	140.52	146.62	202.22
control	003	0.00	27.50	57.30	59.60	99.77	107.00	142.23	140.55	168.68	187.27
control	004	0.00	0.00	152.17	159.98	227.02	380.54	502.66	514.93	574.44	781.45
Media		20.26	32.54	78.74	80.91	104.18	151.29	189.83	204.95	226.81	284.77
Mediana		23.19	42.15	87.99	97.23	88.11	126.95	146.64	173.65	194.50	213.06
DE		33.13	40.21	43.18	29.45	66.52	130.48	179.63	178.90	200.56	288.88
SBT 100	005	39.60	64.75	76.44	78.07	57.54	93.17	112.98	140.09	173.92	245.84
SBT 100	006	40.31	37.27	68.57	73.13	76.46	113.30	130.49	192.56	205.65	189.42
SBT-100	007	85.71	91.27	147.61	149.02	123.96	116.01	157.50	171.29	176.68	200.97
SBT-100	008	48.72	65.19	82.73	83.18	86.90	102.48	106.65	132.19	136.93	175.84
Media		53.58	62.12	83.84	95.85	86.21	106.24	126.65	158.03	173.02	203.02
mediana		44.51	59.97	79.59	80.62	81.68	107.89	121.73	155.69	174.80	195.19
DE		21.82	22.62	36.31	35.69	27.94	10.49	23.06	28.01	28.10	30.34
% T/C		0.0	0.0	42.6	44.2	27.4	34.4	38.0	49.7	51.0	52.6
valor p		0.174	0.310	0.927	0.917	0.296	0.272	0.286	0.350	0.343	0.355

10 Ejemplo 12: Eficacia sdAb de anti-STAT3 VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto de tumor de mama humano ER+/PR+ (MCF-7)

Este ejemplo demuestra la eficacia del sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) en el modelo de xenoinjerto de tumor de mama humano MCF-7 en ratones sin pelo.

15 Los ratones sin pelo atímicos hembra (Crl:NU(Ncr)-Foxn1^{nu}, Charles River) tenían doce semanas de edad con un rango de peso corporal (BW) de 23.0 a 30.1 g en el día 1 del estudio. Los animales fueron alimentados y alojados como se describió anteriormente.

20 Se obtuvieron células de carcinoma de mama humano MCF-7 y se cultivaron como se describió anteriormente, y se usaron para la xenografía de ratón. Tres días antes de la implantación de la célula tumoral, se implantaron por vía subcutánea gránulos de estrógeno (0.36 mg de estradiol, liberación durante 60 días, Innovative Research of America, Sarasota, Florida) entre las escápulas de cada animal de prueba utilizando un trocar esterilizado.

Las células tumorales usadas para la implantación se recogieron durante el crecimiento de la fase logarítmica y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 1×10^8 células/ml. El día de la implantación, cada ratón de prueba recibió 1×10^7 células MCF-7 (0.1 ml de suspensión celular) implantadas por vía subcutánea en el flanco derecho y se monitorizó el crecimiento del tumor a medida que el tamaño promedio se acercaba al rango objetivo de 100-150 mm³. Veintiún días después, designado como Día 1 del estudio, los animales se clasificaron en dos grupos, cada uno de los cuales consistía en cuatro ratones con volúmenes de tumores individuales que iban de 108 a 144 mm³ y los volúmenes tumorales medios del grupo de 117 a 123 mm³.

El sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) se proporcionó como una solución preformulada lista para dosificar a una concentración de 0.41867 mg/ml en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -20°C hasta que se necesitó. La solución de 0.41867 mg/ml proporcionó una dosis de 1 mg/kg en un volumen de dosificación de 23.88 ml/kg. En cada día de tratamiento, solo los viales necesarios de VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) sdAb se descongelaron a temperatura ambiente. Todas las suspensiones de dosificación sobrantes se retuvieron a 4°C según sea necesario para la siguiente dosis.

Se dosificaron dos grupos de ratones atímicos sin pelo de acuerdo con el protocolo que se muestra en la Tabla 34. Todas las dosis de sdAb de vehículo (control) y VHH13 bacteriana anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) tres veces al día, seis horas de diferencia durante catorce días, con dos dosis administradas el día 1 y una dosis administrada en la mañana del día 15 (tid \times 14, primer día 2 dosis). El volumen de dosificación para el sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) bacteriano del vehículo fue de 0.478 ml por 20 gramos de peso corporal (23.88 ml/kg) y se ajustó al peso corporal de cada animal individual. El grupo 1 recibió el vehículo y sirvió como el grupo de referencia para el injerto y la progresión del tumor, así como el control. Al grupo 2 se le administró sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) a 1 mg/kg.

Tabla 34

Diseño del protocolo para el estudio					
		Régimen de tratamiento			
Grupo	n	Agente	mg/kg	Ruta	Programación
1	4	vehículo	-	ip	tid \times 14 primer día 2 dosis
2	4	VHH13	1	ip	tid \times 14 primer día 2 dosis

Los tumores se midieron dos veces por semana, y cada animal se sacrificó cuando su neoplasia alcanzó el volumen final predeterminado (1000 mm³) o al final del estudio, el día 39, lo que ocurriera primero. Cuando un tumor alcanzó el volumen final, se documentó que el animal había sido sometido a eutanasia para la progresión del tumor (TP), con la fecha de la eutanasia. El tiempo hasta el punto final (TTE) para cada ratón se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$TTE = \frac{\log_{10}(\text{volumen final}) - b}{m}$$

donde TTE se expresa en días, el volumen del punto final se expresa en mm³, b es la intersección y m es la pendiente de la línea obtenida por regresión lineal de un conjunto de datos de crecimiento de tumor transformado logarítmicamente. El conjunto de datos consta de la primera observación que excedió el volumen final utilizado en el análisis y las tres observaciones consecutivas que inmediatamente precedieron al logro de este volumen final. El TTE calculado generalmente es menor que la fecha de TP, el día en que el animal fue sacrificado por el tamaño del tumor. A los animales que no alcanzaron el volumen final se les asignó un valor TTE igual al último día del estudio (D39). Cualquier animal clasificado como muerto por causas relacionadas con el tratamiento (TR) se le asignaría un valor de TTE igual al día de la muerte. Cualquier animal clasificado como muerto por causas no relacionadas con el tratamiento (NTR) debía ser excluido de los cálculos de TTE.

La eficacia del tratamiento se determinó a partir del retraso en el crecimiento del tumor (TGD), que se define como el aumento de la TTE media, en días, para un grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control:

$$TGD = T - C$$

El porcentaje de aumento en la mediana TTE, en relación con el grupo de control, es

donde:

$$\%TGD = \frac{T - C}{C} \times 100$$

T = TTE mediana para un grupo de tratamiento, y

C = TTE mediana para el grupo de control designado.

La eficacia del tratamiento en cada grupo puede estar indicada por el volumen mediano del tumor, MTV(n), que se definió como el volumen mediano del tumor en el último día del estudio (D39) en el número de animales restantes (n) cuyos Los tumores no habían alcanzado el volumen final.

La eficacia del tratamiento también se puede determinar a partir de la incidencia y la magnitud de las respuestas de regresión observadas durante el estudio. El tratamiento puede causar regresión parcial (PR) o regresión completa (CR) del tumor en un animal. En una respuesta de PR, el volumen del tumor fue del 50% o menos de su volumen D1 durante tres mediciones consecutivas durante el curso del estudio, y fue igual o superior a 13.5 mm³ para una o más de estas tres mediciones. En una respuesta de CR, el volumen del tumor fue inferior a 13.5 mm³ durante tres mediciones consecutivas durante el curso del estudio. Cualquier animal con una respuesta de CR al final del estudio se clasificó adicionalmente como un sobreviviente libre de tumores (TFS).

Los animales se pesaron diariamente durante los primeros cinco días, luego dos veces a la semana durante el resto del estudio. Los ratones se observaron con frecuencia en busca de salud y signos evidentes de cualquier efecto secundario adverso relacionado con el tratamiento de la TR, y se registraron observaciones clínicas notables. La pérdida de peso corporal individual fue monitoreada por protocolo, y cualquier animal con una pérdida de peso superior al 30% para una medición, o superior al 25% para tres mediciones, debía ser sacrificado por motivos de salud como una muerte TR. Si se recupera el peso corporal medio del grupo, la dosis puede reanudarse en ese grupo, pero con una dosis más baja o un horario de dosificación menos frecuente. La toxicidad aceptable se definió como una pérdida de peso medio en el grupo de menos del 20% durante el estudio y no más de una muerte por TR entre los diez animales tratados, o el 10%. Cualquier régimen de dosificación que resulte en una mayor toxicidad se considera por encima de la dosis máxima tolerada (MTD). Una muerte debía clasificarse como TR si era atribuible a los efectos secundarios del tratamiento, como lo demuestran los signos clínicos y/o la necropsia, o también puede clasificarse como TR si se debe a causas desconocidas durante el período de dosificación o dentro de los 14 días de la última dosis. Una muerte se clasificó como NTR si había evidencia de que la muerte estaba relacionada con el modelo de tumor, en lugar de estar relacionada con el tratamiento. Las muertes por NTR se clasifican además como NTRa (debido a un accidente o error humano), NTRm (debido a la diseminación del tumor confirmada por necropsia por invasión o metástasis) y NTRu (debido a causas desconocidas).

Se empleó Prism 6.07 (GraphPad) para Windows para análisis gráficos. Las estadísticas no fueron empleadas debido al pequeño tamaño de la muestra.

Se construyó una gráfica de dispersión para mostrar los valores de TTE para ratones individuales, por grupo; esta gráfica muestra las muertes por NTR, que se excluyeron de todas las demás cifras. Animales individuales, grupo mediano y volumen tumoral medio se representaron como funciones del tiempo. Cuando un animal abandonó el estudio debido al tamaño del tumor o la muerte por TR, su volumen de tumor registrado final se incluyó con los datos utilizados para calcular la mediana del volumen en los puntos de tiempo posteriores. Se construyó una parcela de Kaplan-Meier para mostrar el porcentaje de animales en cada grupo que permanece en estudio versus tiempo. Las curvas de crecimiento tumoral se truncaron después de que ocurrieran dos muertes por TR en el mismo grupo. Los cambios de BW medios en el grupo durante el transcurso del estudio se representaron como porcentaje de cambio, \pm EEM, desde el día 1. El crecimiento del tumor y las curvas de cambio de peso se truncaron después de que más de la mitad de los ratones evaluables en un grupo salieron del estudio. La figura 10 ilustra el volumen tumoral medio en el estudio.

La Tabla 35 proporciona las pérdidas medias de BW, las muertes TR y NTR para los ratones. Los signos clínicos se registraron cuando se observaron, como se muestra en las Tablas 36-38. No se produjeron muertes por TR durante el estudio. Las pérdidas de peso corporal fueron variables, severas para un animal en cada grupo, y resultaron de los efectos del estrógeno. Las observaciones clínicas que incluyeron pérdida de peso, trompas uterinas agrandadas y cristales de vejiga estuvieron presentes en ambos grupos y también fueron atribuibles a los efectos del estrógeno. La toxicidad por estrógenos dio como resultado dos muertes no relacionadas con el tratamiento en cada grupo. El tratamiento evaluado en el estudio fue tolerado de forma aceptable.

Tabla 35
Resumen de respuesta

Grupo	n	Régimen de tratamiento				Mediana TTE	TC	% TGD	MTV (n) D39	Regresiones			Media BW Nadir	Muertes	
		Agente	mg/kg	ruta	Programar					PR	CR	TFS		TR	NTR
1	2	vehículo	-	ip	tid \times 14 primero Día 2 dosis	23.2	-	-	-	0	0	0	-15.6% Día 25	0	2
2	2	VHH13	1	ip	tid \times 14 primero Día 2 dosis	32.9	9.7	42	-	0	0	0	-21.9% Día 32	0	2

Tabla 36
Peso corporal

Peso corporal																
Grupo 1: vehículo (ip, tid x 14 primeras dosis del Día 2																
Fecha Día de estudio	07/27/15	07/28/15	07/29/15	07/30/15	07/31/15	08/03/15	08/06/15	08/10/15	08/13/15	08/17/15	08/17/15	08/24/15	08/27/15	08/31/15	09/03/15	
A #	1	2	3	4	5	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	
1	Peso (g) 27.50	Peso (g) 28.60	Peso (g) 28.10	Peso (g) 55	Peso (g) 29.40	Peso (g) 26.80	Peso (g) 26.40	Peso (g) 26.50	Peso (g) 26.60	Peso (g) 27.20	NTRa el 08/01/15					
2	Peso (g) 26.30	Peso (g) 27.30	Peso (g) 27.40	Peso (g) 29.30	Peso (g) 27.40	Peso (g) 29.50	Peso (g) 28.20	Peso (g) 26.00	Peso (g) 22.50	Peso (g) 23.60	NTRa el 08/03/15					
3	Peso (g) 30.10	Peso (g) 31.00	Peso (g) 30.50	Peso (g) 27.30	Peso (g) 31.10	Peso (g) 29.50	Peso (g) 28.20	Peso (g) 26.00	Peso (g) 22.50	Peso (g) 23.80	TP EL 08/17/15					
4	Peso (g) 23.00	Peso (g) 24.20	Peso (g) 24.40	Peso (g) 30.00	Peso (g) 25.00	Peso (g) 29.50	Peso (g) 28.20	Peso (g) 26.00	Peso (g) 22.50	Peso (g) 23.80	TP EL 08/20/15					
Media	26.7	27.8	27.6	27.9	28.2	28.2	27.3	26.3	24.6	25.4	23.8					
DE	2.9	2.8	2.5	2.2	2.6	1.9	1.3	0.4	2.9	2.5						
n	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2	1					
Grupo 2: VHH13 (1 mg / kg, ip, tid x 14 primer día 2 dosis)																
Fecha Día de estudio	07/27/15	07/28/15	07/29/15	30/07/15	07/31/15	08/03/15	08/06/15	08/10/15	08/13/15	08/17/15	08/20/15	08/24/15	08/27/15	08/31/15	09/03/15	
A #	1	2	3	4	5	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	
1	Peso (g) 28.90	Peso (g) 29.30	Peso (g) 28.50	Peso (g) 29.60	Peso (g) 28.80	Peso (g) 28.70	Peso (g) 27.80	Peso (g) 28.30	Peso (g) 28.20	Peso (g) 28.80	Peso (g) 29.00	Peso (g) 28.90	Peso (g) TP el 08/24/15	Peso (g) TP el 08/24/15	Peso (g)	
2	Peso (g) 25.30	Peso (g) 27.00	Peso (g) 26.40	Peso (g) 26.40	Peso (g) 26.30	Peso (g) 25.90	Peso (g) 25.80	Peso (g) 26.00	Peso (g) 24.50	Peso (g) 21.90	Peso (g) 20.10	Peso (g) 21.20	Peso (g) 21.20	Peso (g) 28.80	Peso (g)	
3	Peso (g) 27.20	Peso (g) 25.40	Peso (g) 23.90	Peso (g) 27.30	Peso (g) 26.30	Peso (g) 25.90	Peso (g) 25.80	Peso (g) 26.00	Peso (g) 24.50	Peso (g) 21.90	Peso (g) 20.10	Peso (g) 21.20	Peso (g) 21.20	Peso (g) 28.80	Peso (g)	
4	Peso (g) 27.60	Peso (g) 27.50	Peso (g) 27.10	Peso (g) 27.30	Peso (g) 27.20	Peso (g) 26.90	Peso (g) 26.10	Peso (g) 26.00	Peso (g) 24.50	Peso (g) 21.90	Peso (g) 20.10	Peso (g) 21.20	Peso (g) 21.20	Peso (g) 28.80	Peso (g)	
Media	27.3	27.3	26.5	27.8	27.4	27.2	26.6	27.2	26.4	25.4	24.6	25	21.2	23.8	24.2	
DE	1.5	1.6	1.9	1.7	1.3	1.4	1.1	1.6	2.6	4.9	6.3	5.5				
n	4	4	4	3	3	5	3	2	2	2	2	2	1	1	1	

Tabla 37
Medición de tumores

Calibrador de medición																							
Grupo 1: vehículo (ip, tid x 14 primer día 2 dosis)																							
Fecha Día de estudio A #	07/27/15 1	W (mm) L (mm)	07/30/15 4	08/03/15 8	08/06/15 11	08/10/15 15	08/13/15 18	08/17/15 22	08/20/15 25	08/24/15 29	08/27/15 32	08/31/15 36	09/03/15 39										
	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)										
1	6	6	7	8	NTRa el 08/01/15									TP el 08/17/15									
2	5	9	7	9	8	12	9	13	10	13	12	15	TP el 08/20/15										
3	6	7	7	10	9	10	10	12	11	12	11	13	12	14	NTRa el 08/03/15								
4	6	8	7	11	NTRa el 08/03/15																		
Grupo 2: VHH13 (1 mg / kg, ip, tx x 14 primer día 2 dosis)																							
Fecha Día de estudio A #	07/27/15 1	W (mm) L (mm)	07/30/15 4	08/03/15 8	08/06/15 11	08/10/15 15	08/13/15 18	08/17/15 22	08/20/15 26	08/24/15 29	08/27/15 32	08/31/15 36	09/03/15 39										
	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)	W (mm) L (mm)										
1	6	6	7	8	8	10	9	10	9	10	10	11	12	13									
2	6	6	6	6	7	8	8	9	10	12	13	10	10	10									
3	6	7	6	7	8	8	9	9	10	10	10	12	13	13									
4	6	7	6	8	7	10	10	10	10	10	10	12	13	13									
															NTRa en 07/30/15			TP en 08/24/15			NTRa en 08/03/15		

Tabla 38
Volumen del tumor

Volumen del tumor															
Grupo 1: vehículo (ip, tid × 14 primer día 2 dosis)															
Fecha Día de estudio A #	07/27/15	07/30/15	08/03/15	08/06/15	08/10/15	08/13/15	08/17/15	08/20/15	08/24/15	08/27/15	08/31/15	09/03/15			
1	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)		
2	108	196	384	527	650	650	1080								
3	113	221	405	600	726	726	787								
4	126	270													
Media	122.6	232.8	394.5	563.3	688	688	933.3	1008							
SEM	8.1	15.8	10.5	36.8	38	38	146.8								
n8	4	4			222221										
Grupo 2: VHH13 (1 mg / kg, ip, tx 14 primeras dosis del Día 2)															
Fecha Día de estudio A #	07/27/15	07/30/15	08/03/15	08/06/15	08/10/15	08/13/15	08/17/15	08/20/15	08/24/15	08/27/15	08/31/15				
1	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)	TV (mm³)		
2	108	196	320	405	405	405	550	864	1099	1099	TP el 08/24/15	TP el 08/24/15	TP el 08/24/15		
3	108	126	196	196	288	288	405	405	500	500	864	864	1099		
4	126														
	126	144	245	320					NTRa el 07/30/15						
Media	117	155.3	253.7	307	346.5	346.5	477.5	634.5	799.3	500	864	864	1098.5		
SEM	5.2	21	36.1	60.7	58.5	58.5	72.5	229.5	299.3						
n	4	3	3					322222111							

Debido a que dos de los cuatro ratones en el grupo de control y también en el grupo de tratamiento murieron por toxicidad por estrógenos, no se pudo determinar una conclusión estadística. Con los datos disponibles, la mediana del crecimiento del tumor y el volumen medio del tumor se redujeron en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control. Esta diferencia estuvo presente durante los 14 días de tratamiento, pero también hasta el día 25 del estudio. El grupo de control tardó 25 días en alcanzar un volumen tumoral de 1000 mm³, mientras que el grupo de tratamiento tardó 36 días en alcanzar un volumen tumoral de 1000 mm³. Esto sugiere que el sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) desacelera el crecimiento del tumor MCF-7 in vivo. A lo largo del estudio, tanto el grupo control como el grupo de tratamiento mantuvieron ponderaciones similares. Esto sugiere que el VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) sdAb no causó toxicidad con respecto a la pérdida de peso

Ejemplo 13: Tratamiento del cáncer de mama HER2+ (BT474) humano con sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) en ratones con xenoinjerto

En este ejemplo, la eficacia de la sdAb VHH13 bacteriana anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) se determinó en el xenoinjerto de tumor de mama humano BT474 en ratones CB.17 SCID.

Se trataron dos grupos de ratones CB.17 SCID de 8-12 semanas de edad que contenían xenografías de fragmentos de tumor BT474 de 1 mm³ en su flanco según el protocolo que se muestra en la Tabla 39 cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100-150 mm³. Todas las dosis de vehículo (control de PBS) y VHH13 bacteriana anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) sdAb (que se muestra en la Tabla 39 como SB-01) se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) tres veces al día, con seis horas de diferencia durante catorce días, con dos dosis entregadas en el día 1 (tid × 14, primer día 2 dosis). El volumen de dosificación para el sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3) bacteriano del vehículo fue de 0.478 ml por 20 gramos de peso corporal (23.88 ml/kg) y se ajustó al peso corporal de cada animal individual. El grupo 1 recibió el vehículo y sirvió como el grupo de referencia para el injerto y la progresión del tumor, así como el control. Al grupo 2 se le administró sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) a 1 mg/kg.

Tabla 39

Protocolo de estudio

Gr.	N	Régimen 1				
		Agente	Vehículo	mg/kg	Ruta	Programar
1#	4	vehículo		-	ip	tid × 14 primer día 2 dosis
2	4	SB-01		1	ip	tid × 14 primer día 2 dosis

Durante los primeros 14 días del estudio, el grupo de tratamiento recibió anti-STAT3 B VHH13 y el grupo de control solo recibió el vehículo. Como se muestra en la Tabla 40, durante este tiempo, el grupo de tratamiento mantuvo y ganó peso a lo largo del estudio, mientras que el grupo de control tuvo pesos más bajos durante todo el estudio. Esto sugiere que el grupo de tratamiento no experimentó toxicidad por el sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) con respecto a la pérdida de peso. Ambos grupos significaron que el volumen del tumor y el volumen mediano del tumor fueron similares, y exactamente iguales en el día 15 del estudio. En el día 59 del estudio, ambos grupos alcanzaron un volumen tumoral de 700 mm³ cúbicos. Esto sugiere que el sdAb VHH13 (SEQ ID NO: 3) bacteriano anti-STAT3 no redujo el crecimiento de tumores BT474 in vivo en comparación con el grupo de control. La figura 11 ilustra el volumen tumoral medio del grupo.

Tabla 40

Resumen de respuesta de BT474

Grupo	n	Régimen de tratamiento 1					Mediana TTE	TC	% TG D	Estad Sig no	MT V (n) , día 60	P R	C R	TF S	BW Nadir	T R	NT Rm	NT R
		Agente	Vehículo	mg/kg	ruta	programa												
1#	4	vehículo		-	ip	tid × 14 primer día 2 dosis	49.2	-			288 (2)	0	0	0	-9.1 % (3)	0	0	0
2	4	SB-01		1	ip	tid × 14 primer día 2 dosis	60.0	10.8	22		550 (3)	0	0	0	-	0	0	0

Ejemplo 14: Producción de anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra sdAb VHH13 bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3)

5 En este ejemplo, se generaron anticuerpos monoclonales de ratón hacia el sdAb de la invención. Los animales utilizados fueron ratones hembra BALB/c, de 8 a 10 semanas. Se utilizó un adyuvante soluble en agua (CBL). El HAT y el HT utilizados fueron de Sigma-Aldrich.

10 Se usó sdAb anti-STAT3 bacteriano VHH13 (SEQ ID NO: 3) para inmunizar tres ratones y formar estirpes celulares de hibridoma. Los ratones se inmunizaron tres veces, cada uno con adyuvante soluble en agua. En un ratón, el título de suero alcanzó 1/51200. El ratón se sacrificó y se formaron estirpes celulares de hibridoma fusionando células de bazo con la estirpe celular de mieloma Sp2/0.

15 Las células fusionadas se sembraron en placas de 96 pozos por dilución limitada. Las células fusionadas se cultivaron en presencia de HAT y se analizaron 651 clones individuales. De los 651 clones individuales, se identificaron 27 clones positivos que se unían específicamente al antígeno sdAb bacteriano anti-STAT3 (SEQ ID NO: 3).

Ejemplo 15: Citotoxicidad de los anticuerpos de un solo dominio KRAS (G12D) en células de cáncer pancreático humano PANC-1

20 Este ejemplo demuestra los efectos antiproliferativos del sdAb anti-KRAS (G12D) (SEQ ID NO: 2) usando la estirpe de células de cáncer de páncreas humano PANC-1. Para los experimentos, las células PANC-1 se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 90%. En ese momento, los estudios de proliferación se llevaron a cabo utilizando el ensayo MTT como se describió anteriormente.

25 Las propiedades antiproliferativas de sdAB anti-KRAS (G12D) (SEQ ID NO: 2) en células PANC-1 tres días después del tratamiento se muestran en la Tabla 41. Células PANC-1 tratadas con el anti-KRAS (G12D) (SEQ ID NO: 2) el sdAb mostró una inhibición de crecimiento promedio de 19.9 y 37.7 a 50.0 y 100 µg/ml, respectivamente.

30 Tabla 41

Acciones antiproliferativas de sdAb anti-KRAS (G12D) (SEQ ID NO: 2) en células cancerosas PANC-1		
	Promedio Abs ± EE	% de inhibición
Control	0.281 ± 0.017	
50 µg/ml	0.225 ± 0.006	19.9
100 µg/ml	0.175 ± 0.016	37.7

35 De este modo, el sdAb anti-KRAS (G12D) (SEQ ID NO: 2) mostró una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis en las células de cáncer pancreático humano PANC-1.

Ejemplo 16: Inhibición del crecimiento in vitro por sdAb de TNF-alfa

40 Este Ejemplo demuestra el desarrollo del método para determinar la concentración de TNF-alfa y la evaluación de la inhibición de la función de TNF-alfa. La concentración de TNF-alfa requerida para mostrar una modulación medible de la actividad en la estirpe celular de linfoblastos de pulmón humano U937 se evaluó mediante la cuantificación del ATP presente, que señala la presencia de células metabólicamente activas utilizando el ensayo de Viabilidad Celular Luminosa de Promega Cell Titer-GJo®.

45 Las células U937 se sembraron en una placa de microcultivo de poliestireno transparente de 96 pozos (placa de fondo plano de 96 pozos Corning® Costar®, Cat. # 3997) en un volumen total de 90 µL/pozo. Después de 24 horas de incubación en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire, se agregaron a cada pozo 5 µL de 20X, TNF-alfa diluido en serie en el medio de crecimiento por duplicado (10 pt dosis respuesta, mayor concentración 20 ng/mL). Además, se añadieron a cada pozo 5 µL de estaurosporina diluida 20X en medio de crecimiento por duplicado (concentración 1 nM).

50 Después de 24 horas de cultivo en presencia de agentes de prueba, la concentración de compuesto requerida para mostrar la modulación medible de la actividad de TNF-alfa en la estirpe celular U937 según se evaluó por la cuantificación del ATP presente. El porcentaje de crecimiento celular se calculó en relación con los pozos de control sin tratar. Todas las pruebas se realizaron por duplicado en cada nivel de concentración.

55 El valor de EC₅₀ para los agentes de prueba se estimó utilizando Prism 6.05 ajustando los datos a la curva mediante la siguiente ecuación de cuatro parámetros logísticos:

$$Y = \frac{Superior - Inferior}{1 + \left(X/IC_{50}\right)^n} + Inferior$$

donde Superior es el % máximo de absorbancia de control, Inferior es el % mínimo de absorbancia de control a la concentración más alta de agente, Y es el % de absorbancia de control, X es la concentración de agente, IC₅₀ es la concentración de agente que inhibe el crecimiento celular en 50% en comparación con las células de control, y n es la pendiente de la curva.

Las figs. 12 y 13 demuestran que el TNF-alfa es citotóxico para las células U937. La IC₅₀ para TNF-alfa contra U937 es de 95.10 pg/ml. La curva de TNF-alfa muestra un efecto destructor de la dosis.

La fig. 14 demuestra que la citotoxicidad del TNF-alfa contra U937 es inhibida por los tres VHH anti-TNF-alfa diferentes. Cuando el sdAb anti-TNF-alfa VHH62 (SEQ ID NO: 47), el sdAb anti-TNF-alfa VHH 66 (SEQ ID NO: 45) y el sdAb anti-TNF-alfa (SEQ ID NO: 46) se incubaron con una dosis constante de TNF-alfa, a EC₅₀, las tres VHH anti-TNF-alfa inhiben la muerte de U937 por TNF-alfa. El IC₅₀ del sdAb anti-TNF-alfa VHH62 (SEQ ID NO: 47) fue de aproximadamente 713.6 ug/ml. La IC₅₀ del sdAb anti-TNF-alfa VHH69 (SEQ ID NO: 46) fue mayor que 208.055 ug/ml. La IC₅₀ del sdAb anti-TNF-alfa VHH66 (SEQ ID NO: 45) no se pudo determinar porque inhibió completamente la citotoxicidad de TNF-alfa de concentraciones de aproximadamente 1 × 10² ug/ml a 1 × 10² ug/ml de sdAb anti-TNF-alfa VHH66 (SEQ ID NO: 45). En este rango de concentración de sdAb anti-TNF-alfa VHH66 (SEQ ID NO: 45), hay un aumento en el crecimiento de células U937 y, por lo tanto, una completa inhibición de la actividad de TNF-alfa.

Lista de Secuencias

<110> Singh, Sunanda

<120> Anticuerpos de dominio único contra antígenos intracelulares

<130> 7304-51293-4PCT

<150> US 62/067908

<151> 2014-10-23

<150> US 62/148656

<151> 2015-04-16

<150> US 62/188353

<151> 2015-07-02

<150> US 62/210795

<151> 2015-08-27

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 1

```
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tgcgtgcaga ctggagggtc tctgagactc      60
tcctgtgcag tttctggaaa tatcggcagc agctactgca tgggctggtt ccgccaggct      120
ccagggaaga agcgcgaggc ggtcgcacgt attgtacgtg atggtgccac tggctacgca      180
gactacgtga agggccgatt caccatctcc cgagacagcg ccaagaacac tctgtatctg      240
caaatgaaca ggctgatacc tgaggacact gccatctact actgtgcggc agacctgccc      300
ccaggttggt tgaactcaggc gatttggaat tttggttata ggggccaggg aacctgggtc      360
accgtctcct ca                                372
```

<210> 2

ES 2 731 876 T3

<211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 2

```

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

10    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Asn Ile Gly Ser Ser Tyr
      20              25              30

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

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

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

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

      Ala Asp Leu Pro Pro Gly Cys Leu Thr Gln Ala Ile Trp Asn Phe Gly
      100             105             110

      Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120
  
```

15 <210> 3
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Camélido

<400> 3

ES 2 731 876 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110
Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 4
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Camélido

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly
20 25 30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15 <210> 5

ES 2 731 876 T3

<211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 5

	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Gly
	1				5					10					15	
10	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gly	Cys	Met	Gly
					20					25					30	
	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Ala	Leu
			35					40					45			
	Ser	Ser	Arg	Gly	Phe	Ala	Gly	His	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
		50						55				60				
	Phe	Ser	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Val	Lys	Asn	Ala	Val	Tyr	Leu	Gln	Met
	65					70					75					80
	Asn	Thr	Val	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Arg
					85					90					95	
	Glu	Gly	Trp	Glu	Cys	Gly	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Arg	Thr	Ala	Gly	Gly
				100					105					110		
	His	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			115					120					125			

15 <210> 6
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Camélido

<400> 6

ES 2 731 876 T3

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly
          20           25           30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
          50           55           60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
          65           70           75           80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
          85           90           95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
          100          105          110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

5
 <210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Camélido

15
 <400> 7

ES 2 731 876 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly
20 25 30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 8
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Camélido
<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly

15

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 9

<211> 126

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

10

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly
20 25 30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15

<210> 10

<211> 126

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

<400> 10

5

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly
20          25          30
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala Leu
35          40          45
Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50          55          60
Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65          70          75
Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85          90          95
Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100         105         110
His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

<210> 11

10 <211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Camélido

<400> 11

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly

```

20

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 12

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly
20 25 30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Ser
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

5 <400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly
20 25 30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 14

10 <211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Camélido

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Thr Tyr Thr Gly Cys Met Gly

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

10

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15

<210> 16

<211> 127

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

<400> 16

5

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
          20          25          30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
          100          105          110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 17

<211> 127

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

15

<400> 17

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

```

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 18

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

10

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15

<210> 19

<211> 127

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

<400> 19

5

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
          20          25          30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
          100          105          110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 20

<211> 127

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

15

<400> 20

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

```

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 22

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

5 <400> 22

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
          20          25          30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
          100          105          110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 23

10 <211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Camélido

<400> 23

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

```

20

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 24

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 24

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

<400> 25

5

```

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20          25          30
Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35          40          45
Ser Gly Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Thr Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100         105         110
Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

<210> 26

<211> 127

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

15

<400> 26

```

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

```

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

<400> 28

5

```

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser
20          25          30
Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35          40          45
Ser Gly Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Thr Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100         105         110
Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

<210> 29

<211> 127

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

15

<400> 29

```

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

```

ES 2 731 876 T3

20

25

30

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

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

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

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

Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 30

<211> 378

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 30

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc 60
tctctgttag cctctacata caccggctgc atgggctggt tccgccaggc tctgggaaag 120
gagcgcgagg gagtcgcagc tcttagtagc cgtgggttttg ccgggcacta taccgactcc 180
gtgaagggcc gattctccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaagt 240
aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag 300
tgcggtgaga cctggttgga ccggaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc 360
caggtcaccg tctctca 378

<210> 31

<211> 378

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 31

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc 60
tctctgttag cctctacata caccggctgc atgggctggt tccgccaggc tctgggaaag 120
gagcgcgagg gagtcgcagc tcttagtagc cgtgggttttg ccgggcacta taccgactcc 180
gtgaagggcc gattctccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaagt 240
aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag 300
tgcggtgaga cctggttgga ccggaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc 360
ctggtcaccg tctctca 378

<210> 32

	<211> 381		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Camélido		
	<400> 32		
	cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc	60	
	tcctgtgcag cctctggagc caatgggtgt cggagctgca tgggctgggt ccgccaggtt	120	
	ccaggaagg agcgcgaggg ggtttctggt atttcaaccg gtggtcttat tacatactat	180	
	gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccaagaca acaccaagaa cacgctgtat	240	
	ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc gacgagtcgg	300	
	tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg	360	
10	accctgggtca cgtctcctc a	381	
	<210> 33		
	<211> 381		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Camélido		
20	<400> 33		
	catgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc	60	
	tcctgtgcag cctctggagc caacgggtgt cggagctgca tgggctgggt ccgccaggtt	120	
	ccaggaagg agcgcgaggg ggtttctggt atttcaaccg gtggtcttat tacatactat	180	
	gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccaagaca acaccaagaa cacgctgtat	240	
	ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc gacgagtcgg	300	
	tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg	360	
	accaggtca ctgtctcctc a	381	
	<210> 34		
	<211> 381		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Camélido		
30	<400> 34		
	gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc	60	
	tcctgtgcag cctctggagc caatgggtgt cggagctgca tgggctgggt ccgccaggtt	120	
	ccaggaagg agcgcgaggg ggtttctggt atttcaaccg gtggtcttat tacatactat	180	
	gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccaagaca acaccaagaa cacgctgtat	240	
	ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc gacgagtcgg	300	
	tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg	360	
	accctgggtca cgtctcctc a	381	
	<210> 35		
35	<211> 378		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 731 876 T3

	<220>		
	<223> Camélido		
	<400> 35		
5		cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc	60
		tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctggg tccgccaggc tcctggaaaag	120
		gagcgcgagg gagtgcgagc tcttagcagc cgtgggtttg ccgggcacta taccgactcc	180
		gtgaagggcc gattctccat ctcccagagc tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaag	240
		aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag	300
		tgcggtgaga cctggttga ccggaccgcc gggagccata cctactgggg ccaggggacc	360
		ctggtcaccg tctcctca	378
	<210> 36		
	<211> 378		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Camélido		
15	<400> 36		
		gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc	60
		tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctggg tccgccaggc tcctggaaaag	120
		gagcgcgagg gagtgcgagc tcttagtagc cgtgggtttg ccgggcacta taccgactcc	180
		gtgaagggcc gattctccat ctcccagagc tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaag	240
		aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag	300
		tgcggtgaga cctggttga ccgaaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc	360
20		ctggtcaccg tctcctca	378
	<210> 37		
	<211> 381		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Camélido		
30	<400> 37		
		gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc	60
		tcctgtgcag cctctggagc caatggtggg cgagagctga tgggctggtt ccgccagggtt	120
		ccagggaagg agcgcgaggg ggtttctggg atttcaaccg gtggtcttat tacatactat	180
		gccgactccg tgaagggtcg attcaccatc tcccaagaca acaccaagaa cagctgtat	240
		ctgcaaata gacgctgaa acctgaggac actgcatgt actactgtgc gacgagtcgg	300
		tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg	360
		acccagggtca ccgtctctc a	381
	<210> 38		
35	<211> 378		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
40	<223> Camélido		

ES 2 731 876 T3

<400> 38

catgtgcagc	tggtggagtc	tggggggggc	tcggtgcagg	ctggaggctc	tctgagactc	60
tcctgtgtag	cctctacata	caccggctgc	atgggctggt	tccgccaggc	tcctggaaaag	120
gagcgcgagg	gagtcgcagc	tcttagtagc	cgtgggtttg	ccgggcacta	taccgactcc	180
gtgaagggcc	gattctccat	ctcccagac	tacgtcaaga	atgcggtgta	tctgcaaattg	240
aacactgtga	aacctgagga	cgctgccatg	tactactgtg	cagcacggga	gggatgggag	300
tgcggtgaga	cctggttgga	ccggaccgcc	ggggggcata	cctactgggg	ccaggggacc	360
caggtcaccg	tctcctca					378

5

<210> 39
<211> 381
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Camélido

<400> 39

15

gatgtgcagc	tggtggagtc	tggggggggc	tcggtgcagg	ctggagggtc	tctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggagc	caatggtggt	cggagctgca	tggtctggtt	ccgccagggtt	120
ccagggaagg	agcgcgaggg	ggtttctggt	atttcaaccg	gtggtcttat	tacatactat	180
gccgactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tcccaagaca	acaccaagaa	cacgtgttat	240
ctgcaaataa	acagcctgaa	acctgaggac	actgccatgt	actactgtgc	gacgagtcgg	300
tttgactgct	atagaggctc	ttggttcaac	cgatatatgt	ataacagttg	gggccagggg	360
accaggtca	ccgtctctc	a				381

<210> 40
<211> 381
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Camélido

25

<400> 40

caggtgcagc	tggtggagtc	tggggggggc	tcggtgcagg	ctggagggtc	tctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggagc	caatggtggt	cggagctgca	tggtctggtt	ccgccagggtt	120
ccagggaagg	agcgcgaggg	ggtttctggt	atttcaaccg	gtggtcttat	tacatactat	180
gccgactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tcccaagaca	acaccaagaa	cacgtgttat	240
ctgcaaataa	acagcctgaa	acctgaggac	actgccatgt	actactgtgc	gacgagtcgg	300
tttgactgct	atagaggctc	ttggttcaac	cgatatatgt	ataacagttg	gggccagggg	360
accaggtca	ccgtctctc	a				381

30

<210> 41
<211> 378
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Camélido

<400> 41

ES 2 731 876 T3

		gatgtgcagc tggaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagactc tctgagactc	60
		tctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctggt tccgccaggc tctggaaag	120
		gagcgcgagg gagtgcagc tcttagtagc cgtgggtttg ccgggcacta taccgactcc	180
		gtgaagggcc gattctccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaag	240
		aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag	300
		tgcggtgaga cctggttga ccggaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc	360
		ctggtcactg tctcctca	378
5	<210> 42 <211> 378 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Camélido		
	<400> 42		
		gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctcg gtgcaggctg gagggctctc gagactctcc	60
		tgtgcagcct ctggagccaa tggaggctcg agctgcatgg gctggttccg ccaggttcca	120
		gggaaggagc gtgaggggtt ttctggtatt tcaaccggtg gtcttattac atactatgcc	180
		gactccgtga agggccgatt caccatctcc caagacaaca ccaagaacac gctgtatctg	240
		caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgcgac ggtcgggtt	300
		gactgctata gaggctcttg gttcaaccga tatatgtata acagttgggg ccaggggacc	360
		ctggtcactg tctcctca	378
15	<210> 43 <211> 378 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Camélido		
	<400> 43		
25		gtgcagctgg tggagtctga gggaggctcg gtgcaggctg gagggctctc gagactctcc	60
		tgtgcagcct ctggagccaa tggaggctcg agctgcatgg gctggttccg ccaggttcca	120
		gggaaggagc gcgaggggtt ttctggtatt tcaaccggtg gtcttattac atactatgcc	180
		gactccgtga agggccgatt caccatctcc caagacaaca ccaagaacac gctgtatctg	240
		caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgcgac ggtcgggtt	300
		gactgctata gaggctcttg gttcaaccga tatatgtata acagttgggg ccaggggacc	360
		ctggtcaccg tctcctca	378
30	<210> 44 <211> 378 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Camélido		
	<400> 44		

ES 2 731 876 T3

```

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctcg gtgcaggctg gagggctctt gagactctcc      60
tgtgcagcct ctggagccaa tggtagctcg agctgcatgg gctggttcgg ccagggtcca      120
gggaaggagc gcgagggggg ttctggtatt tcaaccggtg gtcttattac atactatgcc      180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc caagacaaca ccaataaacac gctgtatctg      240
caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgacgac gactcggttt      300
gactgctata gaggctcttg gttcaaccga tatatgtata acagttgggg ccaggggacc      360
ctggtcactg tctcctca                                     378

```

5 <210> 45
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Camélido

<400> 45

```

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Leu Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
50           55           60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
100          105          110

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

```

15 <210> 46
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Camélido

<400> 46

25

```

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

```

ES 2 731 876 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ser Arg Tyr Asn
20 25 30

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

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

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

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

Ala Ala Arg Thr Tyr Gly Thr Ile Ser Leu Thr Pro Ser Asp Tyr Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Camélido

<400> 47

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Ser Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 48
<211> 123

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Camélido

<400> 48

```

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
50          55          60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
100         105         110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

10 <210> 49
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Camélido

<400> 49

ES 2 731 876 T3

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

<210> 50
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

<400> 50

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

<210> 51

ES 2 731 876 T3

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 51

```

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
50          55          60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
100         105         110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115          120
  
```

10

<210> 52
 <211> 123
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

20 <400> 52

ES 2 731 876 T3

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Camélido

<400> 53

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Leu Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
100 105 110

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

<210> 54

ES 2 731 876 T3

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 54

```

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
50          55          60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
100         105         110

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

```

10

<210> 55
 <211> 123
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

20 <400> 55

ES 2 731 876 T3

```

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Leu Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
          50          55          60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
          100          105          110

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

```

<210> 56
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

<400> 56

```

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Leu Ala Thr His Ala Asp Ser Val Lys
          50          55          60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser Leu
65          70          75          80
Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
          100          105          110

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

```

<210> 57

ES 2 731 876 T3

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 57

```

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys
          50          55          60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
          100          105          110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

10

<210> 58
 <211> 123
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

20 <400> 58

ES 2 731 876 T3

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

<210> 59
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

<400> 59

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

<210> 60

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 60

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Asp Ser Phe Gly
          20          25          30

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

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

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

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

Ala Ala Arg Thr Tyr Gly Ser Val Ser Ser Trp Thr Gly Tyr Lys Tyr
          100          105          110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          115          120
    
```

10

<210> 61
 <211> 123
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

20 <400> 61

ES 2 731 876 T3

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

<210> 62
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

<400> 62

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

<210> 63

<211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 63

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Asp Thr Ser Lys Ser Asp
          20              25              30

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

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

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

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

Ala Ala Arg Phe Arg Ile Tyr Gly Gln Cys Val Glu Asp Asp Asp Ile
          100              105              110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115              120              125
    
```

10

<210> 64
 <211> 124
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

20 <400> 64

ES 2 731 876 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ser Arg Tyr Asn
20 25 30

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

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

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

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

Ala Ala Arg Thr Tyr Gly Thr Ile Ser Leu Thr Pro Ser Asp Tyr Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65
<211> 128
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Camélido

<400> 65

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Trp Glu Leu Val
35 40 45

Ser Asn Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Ser Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Phe Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80
Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys His Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Arg Glu Tyr
100 105 110

Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 66

ES 2 731 876 T3

<211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Camélido

<400> 66

```

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
          35          40          45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
          50          55          60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
          100          105          110

Tyr Cys Ser Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          115          120          125
  
```

10 Ser

<210> 67
 <211> 129
 <212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Camélido

20 <400> 67

ES 2 731 876 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ala	Glu	Ala
			20					25					30		
Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	His	Glu	Cys	Glu	Leu	Val
		35					40					45			
Ser	Thr	Ile	Thr	Thr	Glu	Gly	Ile	Thr	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Tyr	Tyr
	50					55					60				
Ala	Asp	Ser	Val	Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys
65					70					75					80
Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala
				85					90					95	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Pro	Asp	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp
			100					105					110		
Tyr	Cys	Thr	Trp	Ala	Gln	Gly	Thr	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
		115					120					125			

Ser

<210> 68

<211> 129

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

10

<400> 68

Gln	Val	Gln	Pro	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ala	Glu	Ala
			20					25					30		
Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	His	Glu	Cys	Glu	Leu	Val
		35					40					45			

ES 2 731 876 T3

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Ala Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 69
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Camélido

<400> 69

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Ser Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 70
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

<400> 70

5

```

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
          35          40          45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50          55          60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
          100          105          110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
          115          120          125

Ser

```

<210> 71

<211> 129

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

15

<400> 71

ES 2 731 876 T3

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
 50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
 100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 72

<211> 129

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

10

<400> 72

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
 50 55 60

ES 2 731 876 T3

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 73

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 73

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 74

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

ES 2 731 876 T3

<400> 74

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

5 <210> 75
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Camélido

<400> 75

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

ES 2 731 876 T3

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Ser Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 76
<211> 129
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Camélido

<400> 76

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala

ES 2 731 876 T3

85

90

95

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 77

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 77

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 78

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 78

ES 2 731 876 T3

```

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Val Cys Glu Leu Val
          35          40          45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
          50          55          60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
          100          105          110

Tyr Cys Ser Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
          115          120          125

```

Ser

<210> 79

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

10

<400> 79

```

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Leu Glu Cys Glu Leu Val

```

ES 2 731 876 T3

35

40

45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Ala
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Glu Tyr
100 105 110

Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 80

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Camélido

<400> 80

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 81

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 731 876 T3

<220>

<223> Camélido

<400> 81

5

```

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

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val
          35          40          45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Val Ala Ser Ser Tyr Tyr
50          55          60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp
          100          105          110

Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
          115          120          125

Ser

```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado, el polipéptido aislado que comprende un anticuerpo de dominio único anti-STAT3 (sdAb) que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3.
2. Un polipéptido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un anticuerpo anti - dominio único STAT3 (sdAb), en el que el sdAb anti - STAT3 comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3.
3. El sdAb como se reivindica en la reivindicación 2, para uso como medicamento.
4. El sdAb para el uso como se reivindica en la reivindicación 3, en el que el sujeto es un mamífero; preferiblemente un humano.
5. El sdAb para el uso como se reivindica en la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el sdAb se administra en combinación con uno o más compuestos, preferiblemente en el que el uno o más compuestos es un inhibidor de la transcripción.
6. El sdAb para el uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el medicamento es para administración intravenosa, administración intramuscular, administración oral, administración rectal, administración enteral, administración parenteral, administración intraocular, administración subcutánea, administración transdérmica, administración como gotas para los ojos, administración en forma de aerosol nasal, administración por inhalación o nebulización, administración tópica y administración como fármaco implantable.
7. Un método para medir los niveles de un sdAb como se reivindica en la reivindicación 2 en una muestra de un sujeto, el método comprende los pasos de:
 - a) generar un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra uno o más dominios de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3;
 - b) realizar un inmunoensayo cuantitativo en una muestra del sujeto, en el que el inmunoensayo cuantitativo puede comprender opcionalmente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), marcado específico de analitos y ensayo de recaptura (SALRA), cromatografía líquida, espectrometría de masas, clasificación de células activadas por fluorescencia, o una combinación de los mismos, con el anticuerpo monoclonal de ratón y la muestra para determinar la cantidad de sdAb en un sujeto; y
 - d) cuantificar la cantidad de sdAb en el sujeto.

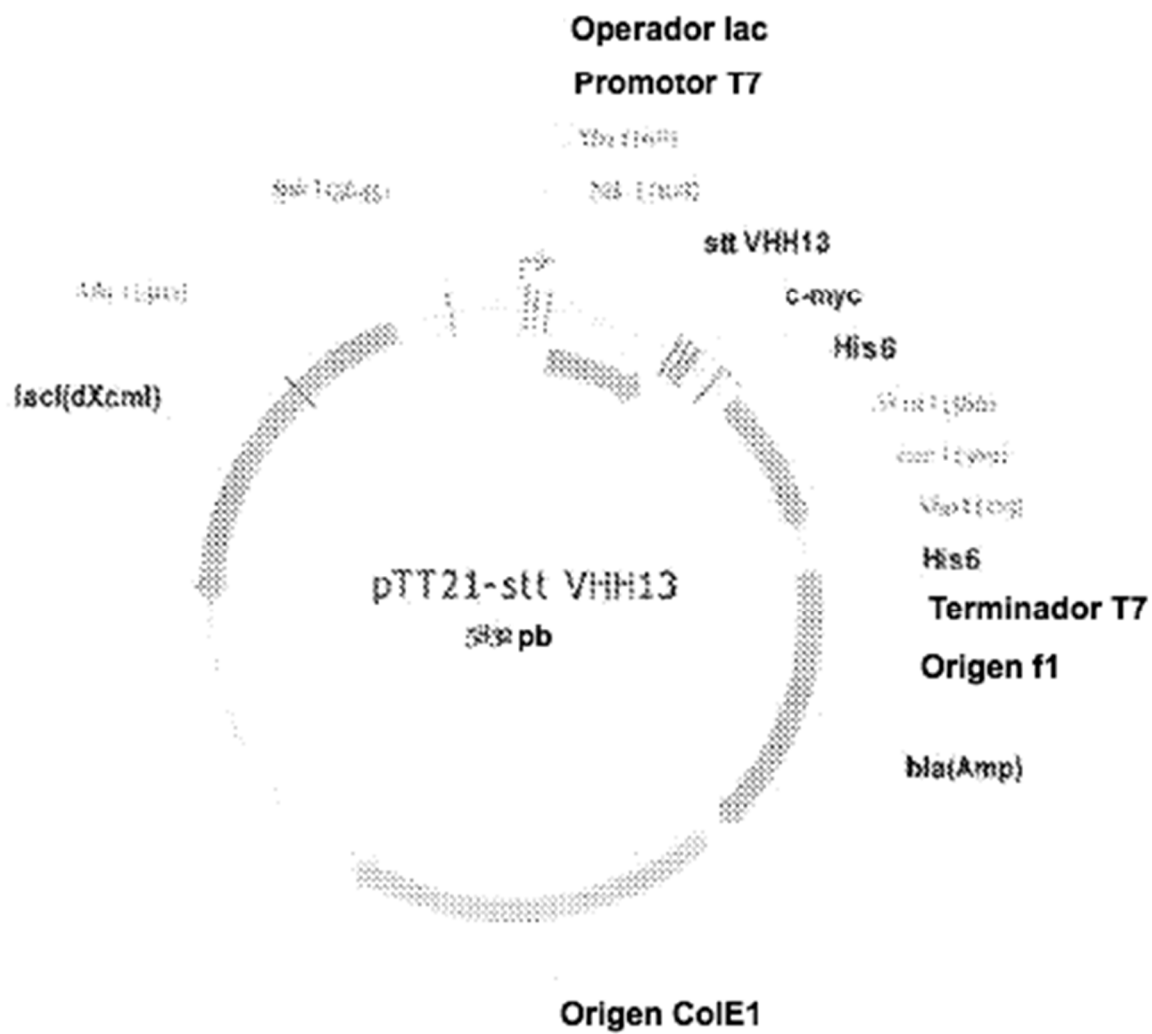


FIG. 1

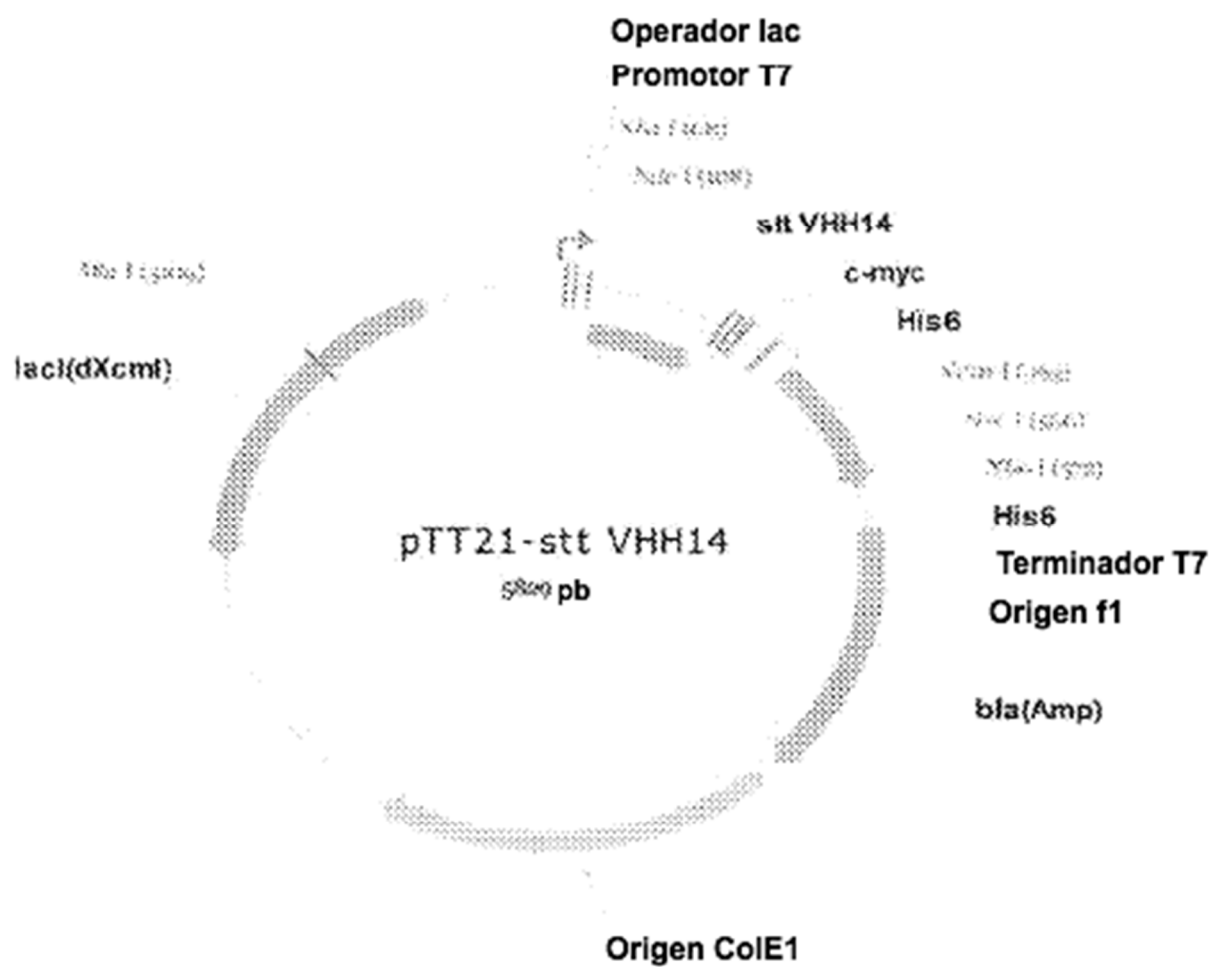
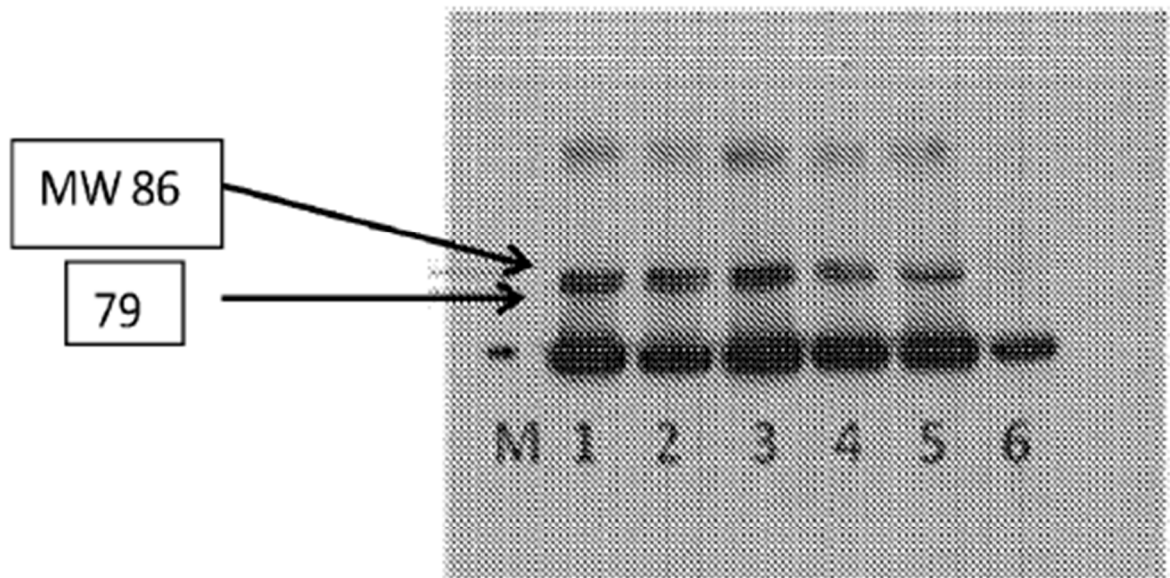


FIG. 2



Carriles:

M- Marcador

1- STAT3 VHH13 (mamífero)

2- STAT3 VHH14 (mamífero)

3- STAT3 VHH13 (bacteriano)

4- STAT3 VHH14 (bacteriano)

5- Control positivo (STAT-3)

6- Control negativo (STAT-1)

FIG. 3

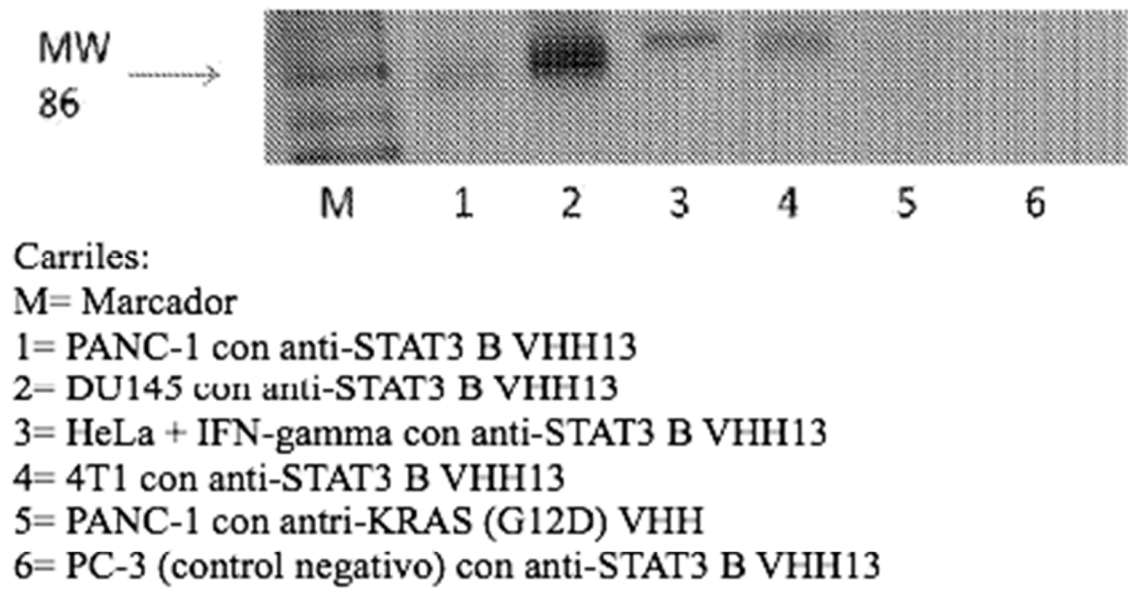


FIG. 4

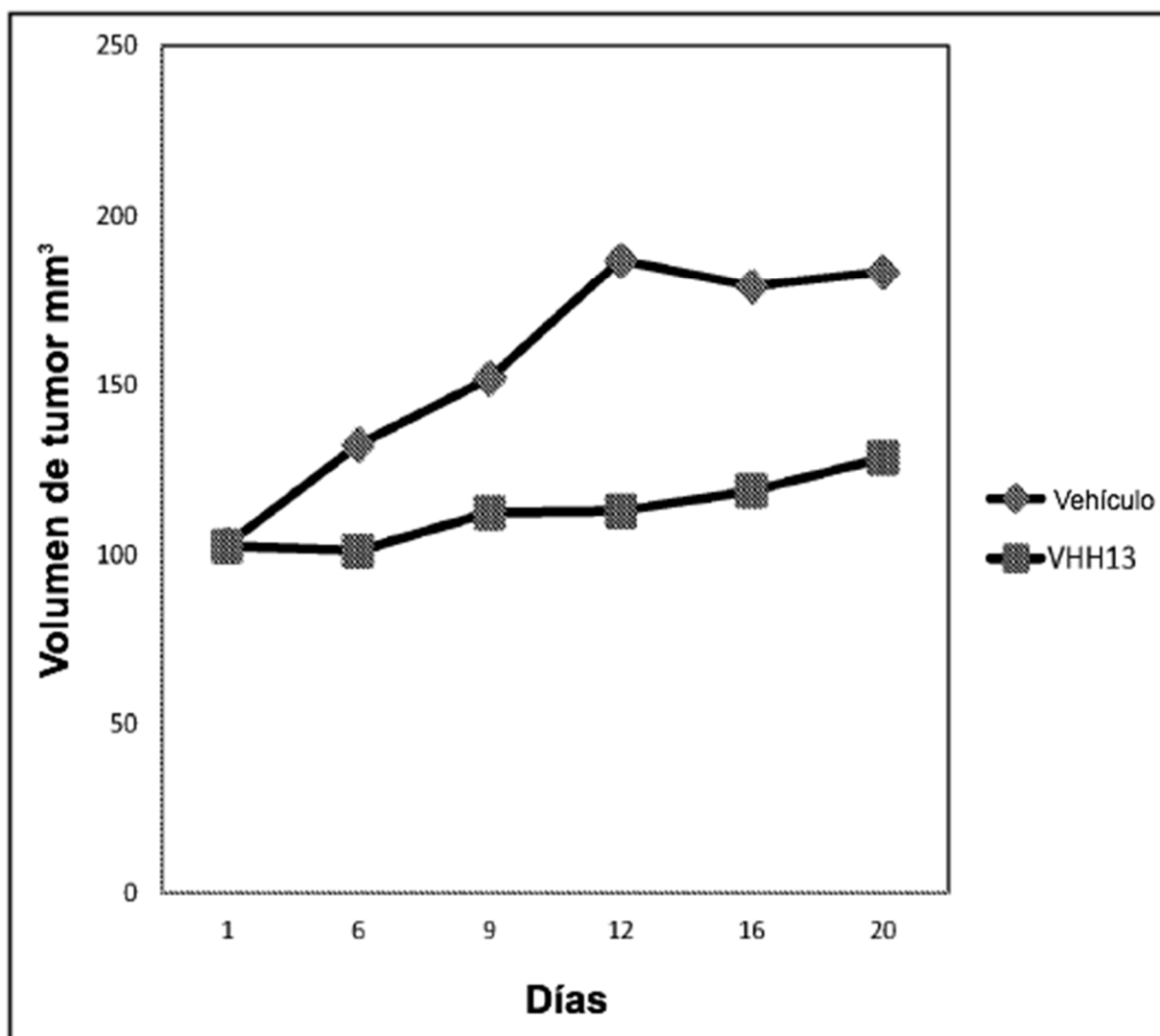
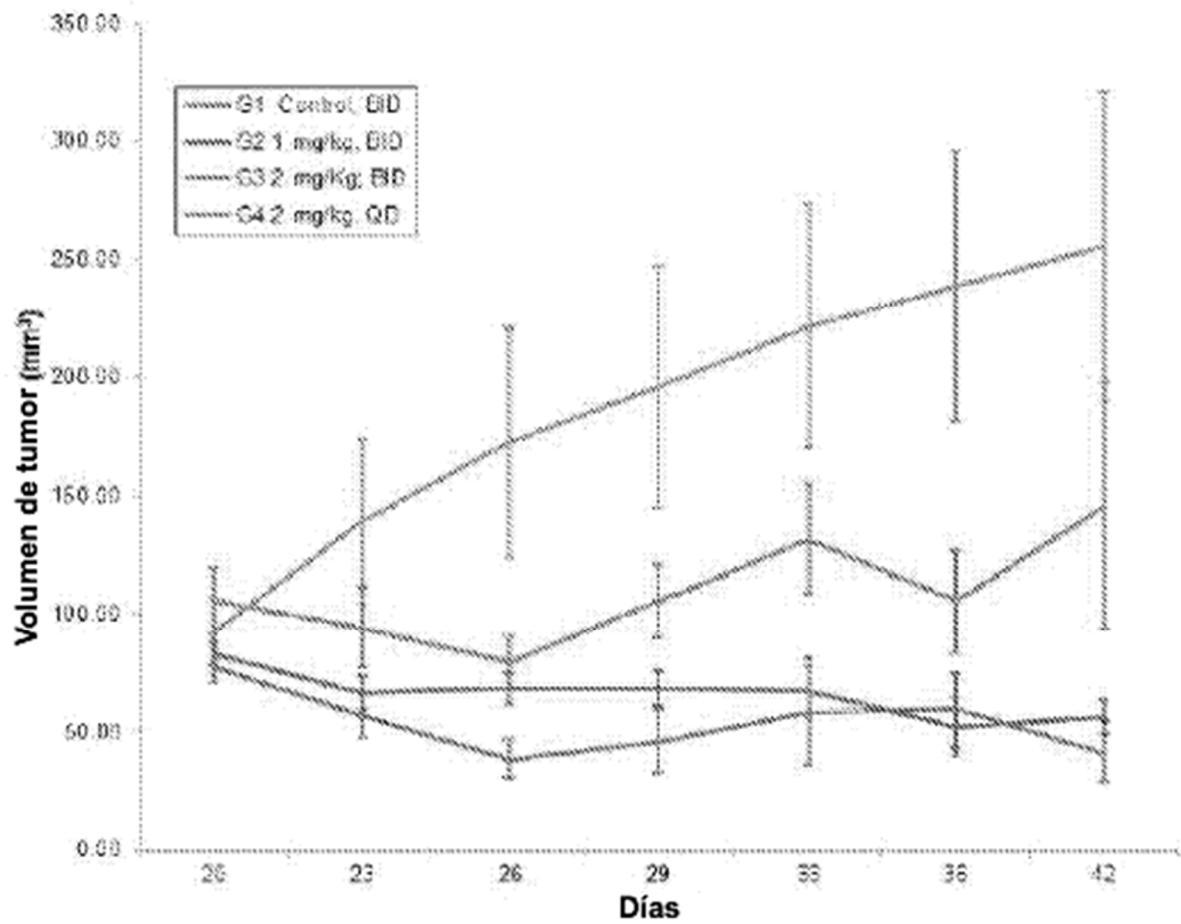


FIG. 5



Curva superior: G1 es el grupo de control con vehículo solo IP; dado dos veces al día
 Segunda curva: G2 se da anti-STAT3 B VHH13 IP; 1 mg/kg/dos veces al día
 Tercera curva al inicio: G3 se da anti-STAT3 B VHH13 IP; 2 mg/kg/dos veces al día
 Curva inferior al inicio: G4 se da anti-STAT3 B VHH13 2 mg/kg/una vez al día

FIG. 6

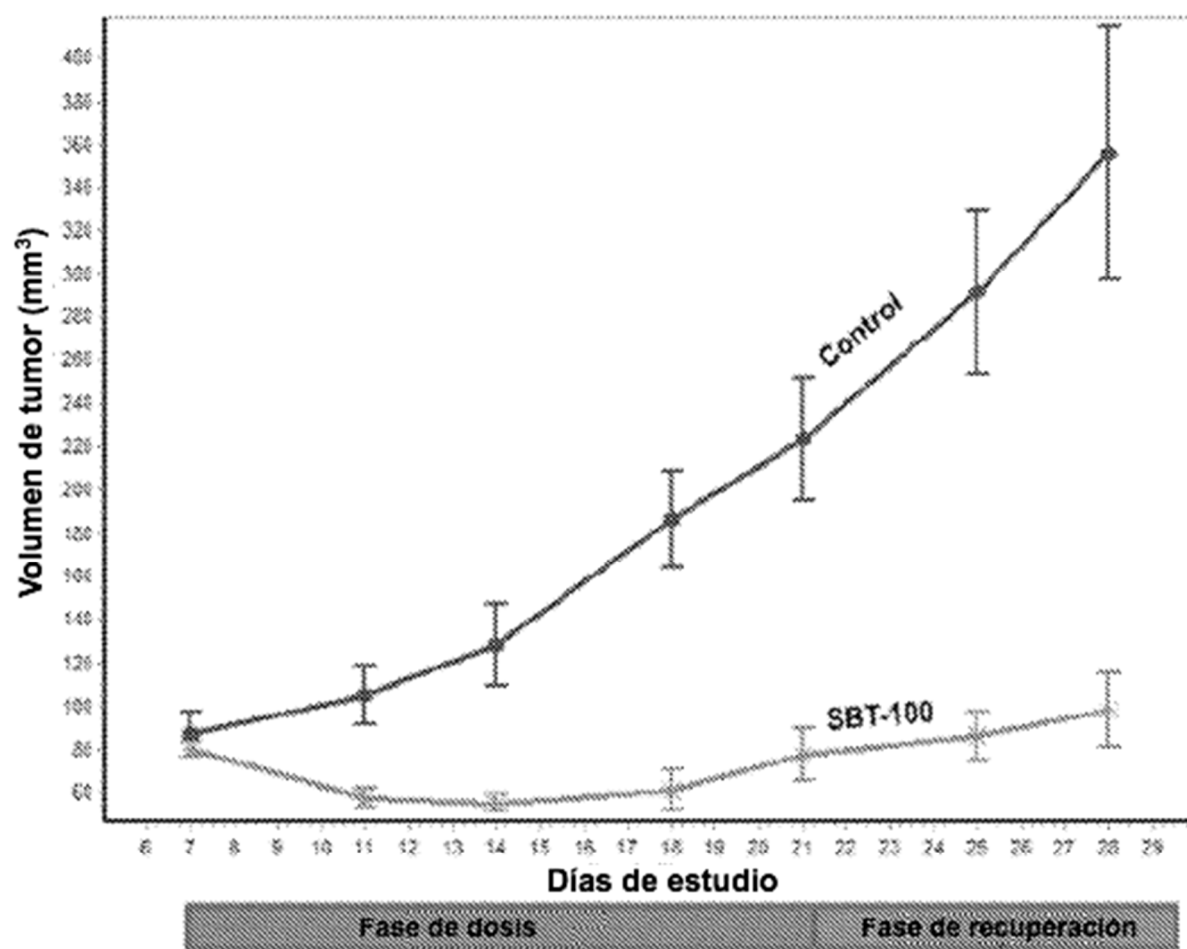


FIG. 7

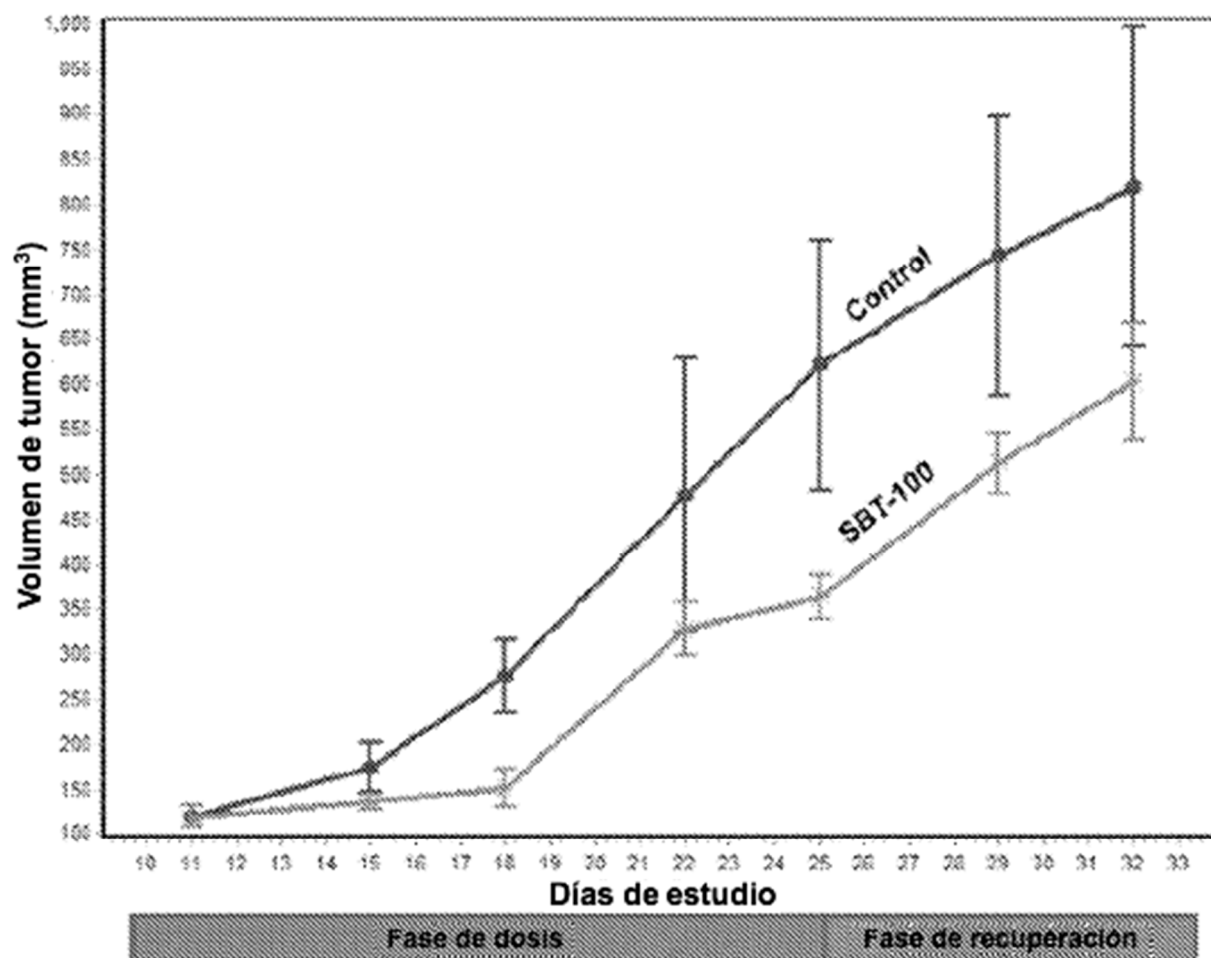


FIG. 8

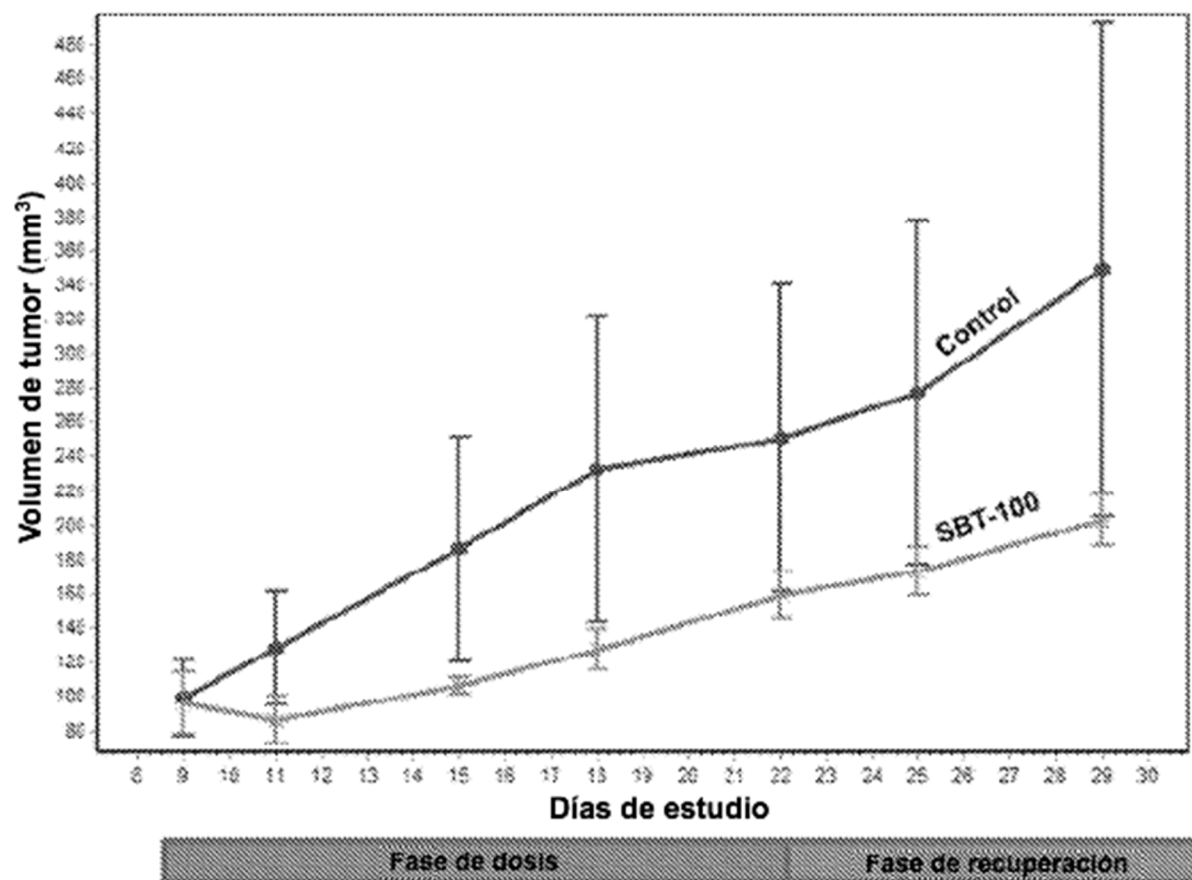


FIG. 9

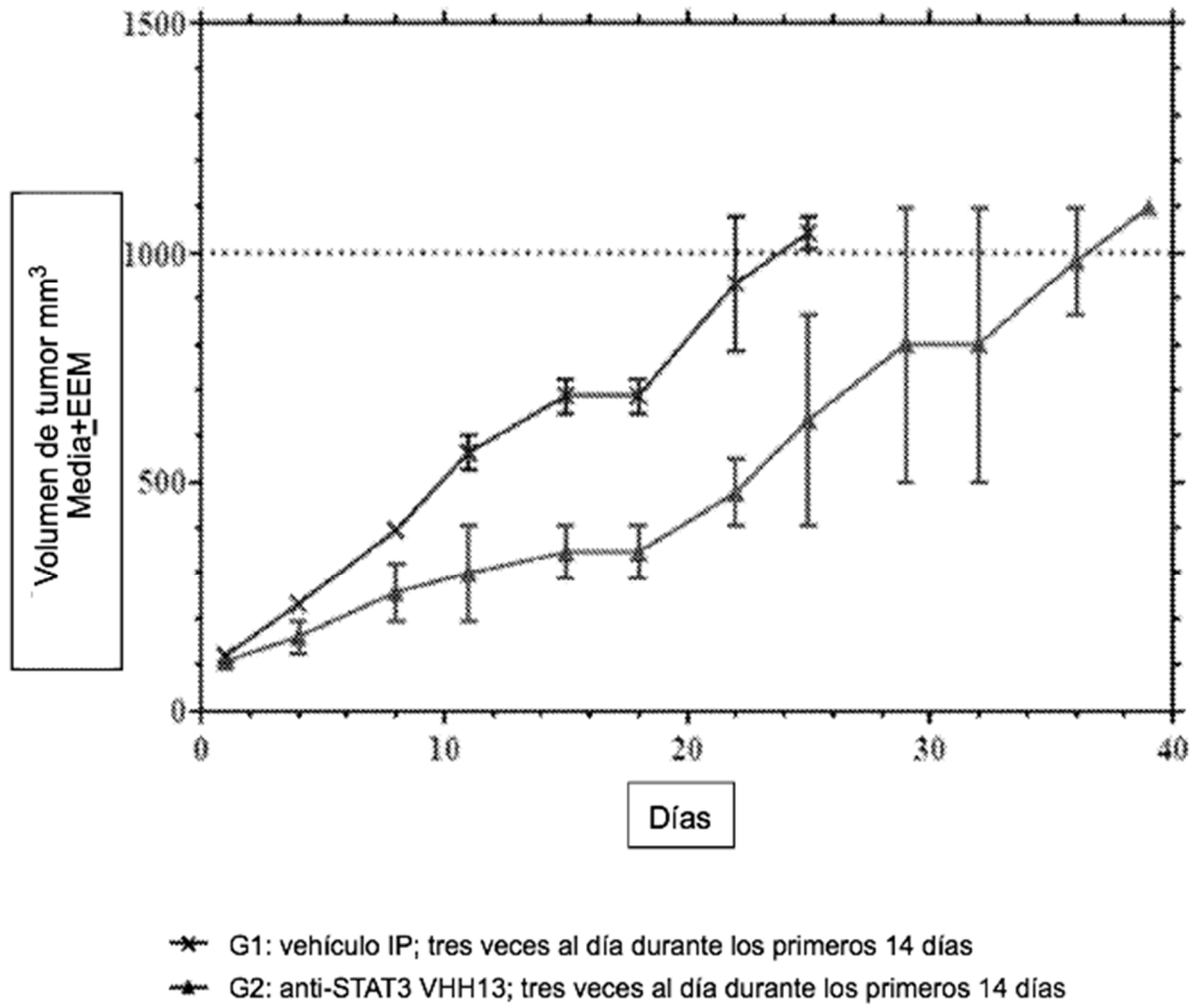


FIG. 10

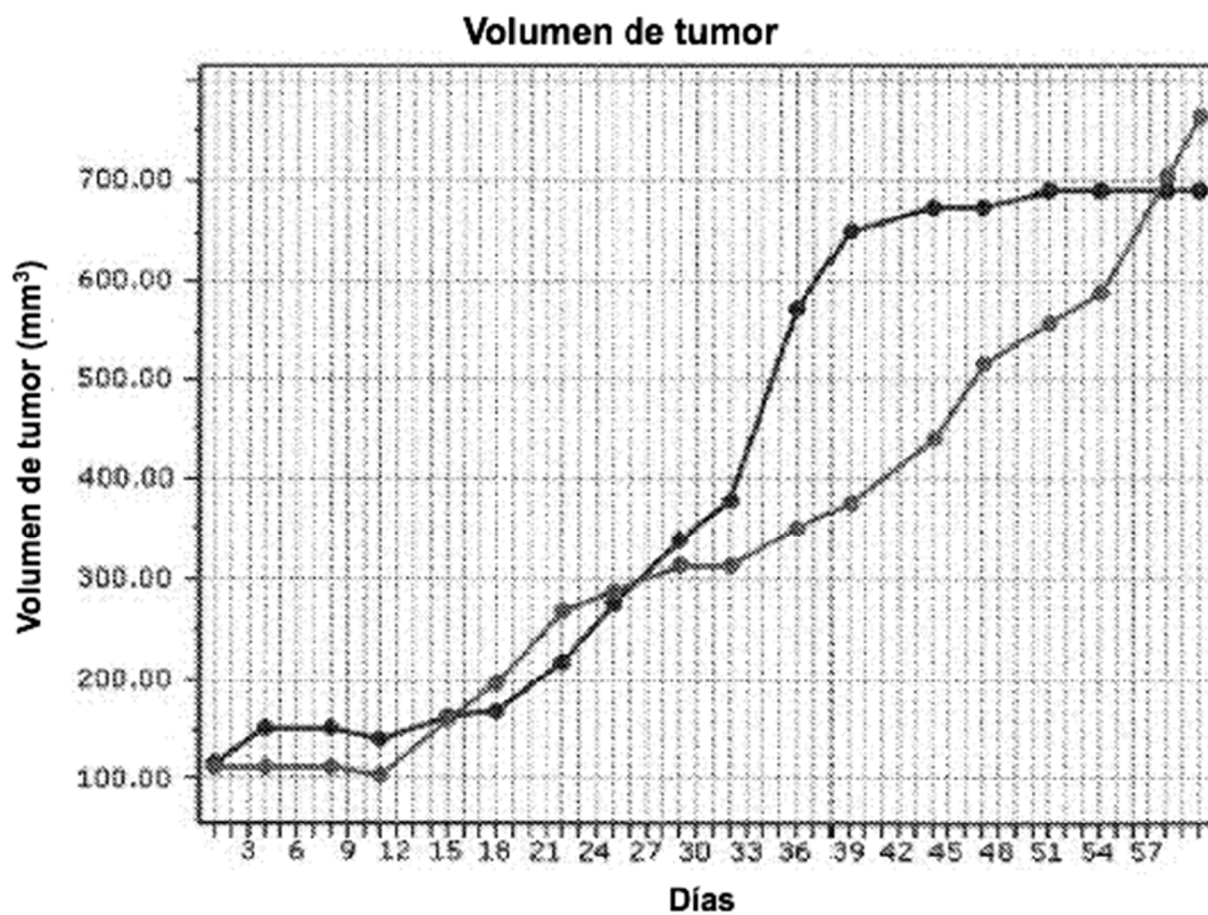
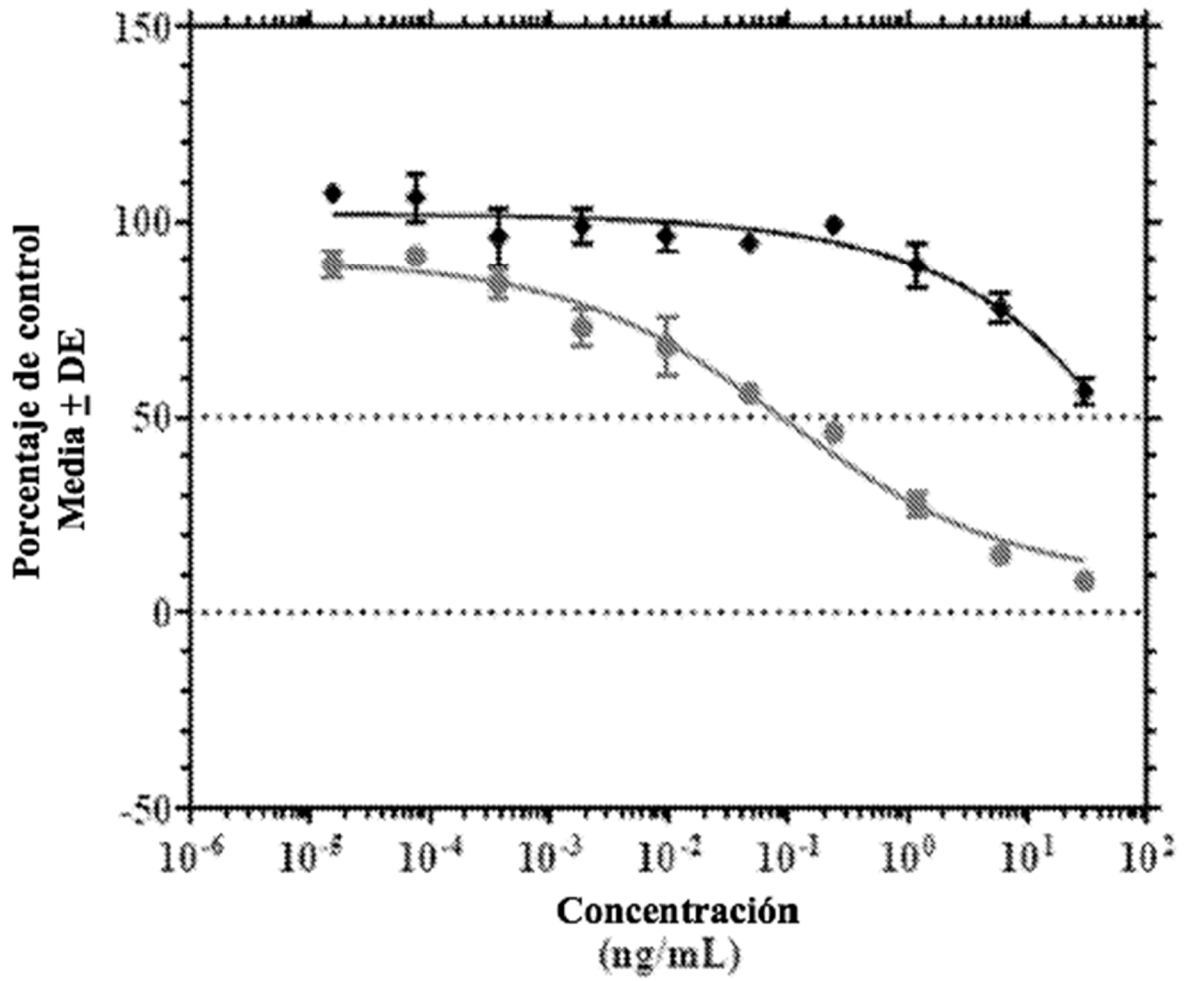


FIG. 11



IC₅₀ media



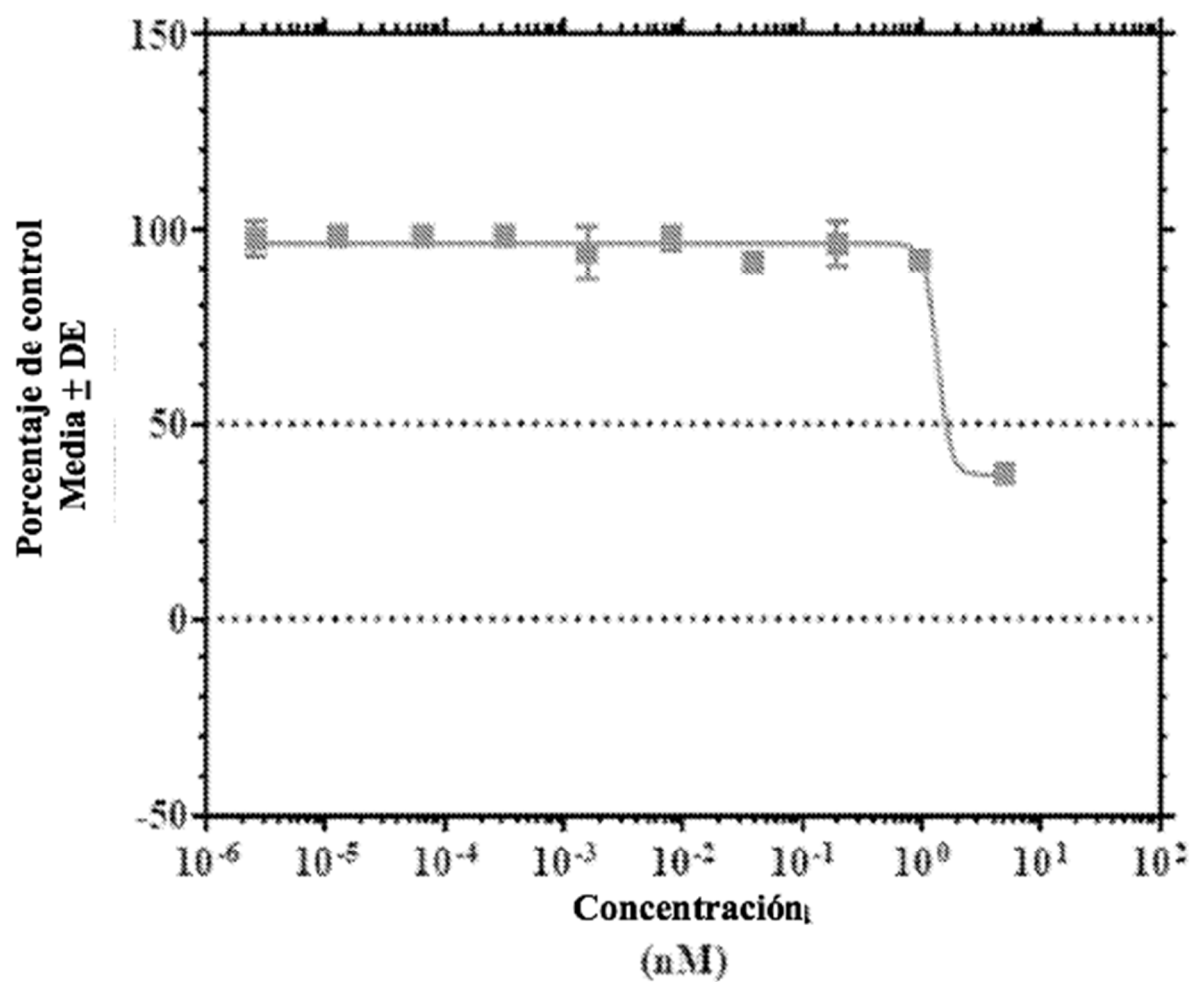
 TNFα (IC₅₀ – 95.10 pg/mL)
 TNFα + Estaurosporina constante(1 nM) (IC₅₀ > 30 ng/mL)

FIG. 12



IC₅₀ media

■ Estaurosporina (IC₅₀ No determinado)

FIG. 13

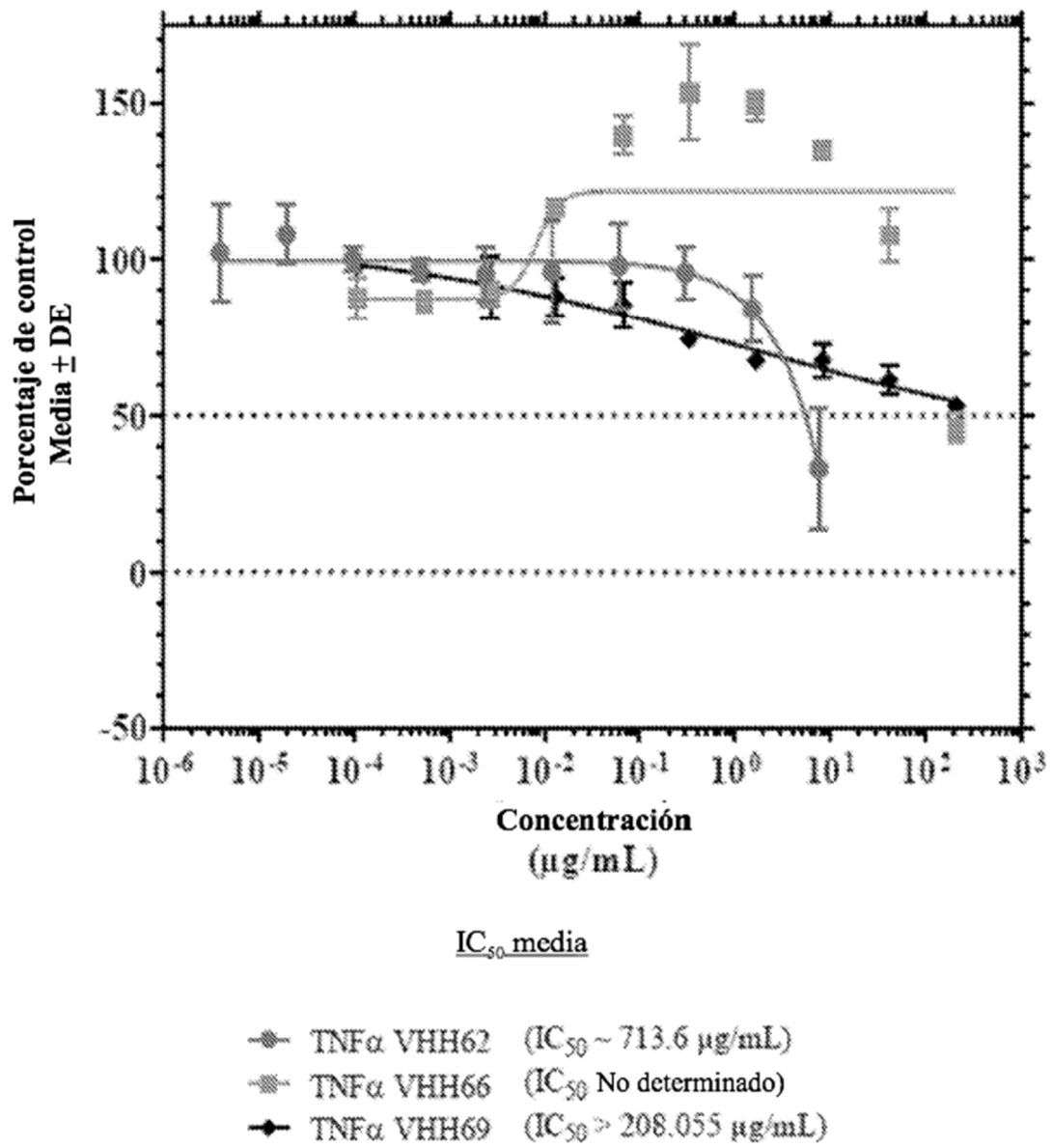


FIG. 14